



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12N 15/52, 15/76, C07K 7/06, C12N 1/21, A61K 38/08, C07C 229/36, 229/42, 321/28, C07D 295/135 // (C12N 1/21, C12R 1:465)		A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 96/01901 (43) Date de publication internationale: 25 janvier 1996 (25.01.96)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR95/00889 (22) Date de dépôt international: 4 juillet 1995 (04.07.95)			Juine (FR). PARIS, Jean-Marc [FR/FR]; 8, rue des Acacias, F-77360 Vaires-sur-Marne (FR). DUTRUC-ROSSET, Gilles [FR/FR]; 21, avenue du Docteur-Arnold-Netter, F-75012 Paris (FR).
(30) Données relatives à la priorité: 94/08478 8 juillet 1994 (08.07.94)		FR	(74) Mandataire: LE COUPANE, Pascale; Rhône-Poulenc Rorer S.A., Direction Brevets, 20, avenue Raymond-Aron, F-92160 Antony (FR).
(71) Déposant (<i>pour tous les Etats désignés sauf US</i>): RHONE-POULENC RORER S.A. [FR/FR]; 20, avenue Raymond-Aron, F-92160 Antony (FR).			(81) Etats désignés: AM, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CZ, EE, FI, GE, HU, IS, JP, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LT, LV, MD, MG, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SG, SI, SK, TJ, TT, UA, UG, US, UZ, VN, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
(72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (<i>US seulement</i>): BLANC, Véronique [FR/FR]; 210, avenue Daumesnil, F-75012 Paris (FR). THIBAUT, Denis [FR/FR]; 28, rue Jean-Colly, F-75013 Paris (FR). BAMAS-JACQUES, Nathalie [FR/FR]; 16, rue Plumet, F-75015 Paris (FR). BLANCHE, Francis [FR/FR]; 41, rue des Solitaires, F-75019 Paris (FR). CROUZET, Joël [FR/FR]; 48-52, rue des Meuniers, F-75012 Paris (FR). BARRIERE, Jean-Claude [FR/FR]; Résidence des Hauts-de-Bures, 24, rue Max-Ernst, F-91440 Bures-sur-Yvette (FR). DEBUSSCHE, Laurent [FR/FR]; 112, avenue Jean-Jaurès, F-91200 Athis-Mons (FR). FAMECHON, Alain [FR/FR]; 10, rue Bourg-sur-Juine, F-91510 Janville-sur-		Publiée	Avec rapport de recherche internationale.
(54) Title: STREPTOGRAMINES AND METHOD FOR PREPARING SAME BY MUTASYNTHESIS			
(54) Titre: STREPTOGRAMINES ET PROCEDE DE PREPARATION DE STREPTOGRAMINES PAR MUTASYNTHÈSE			
(57) Abstract			
Novel group B streptogramine-like compounds of general formula (I), and a method for preparing streptogramines by mutasynthesis using a mutated micro-organism to influence the biosynthesis of at least one of the precursors of group B streptogramines, are disclosed. Novel nucleotide sequences involved in the biosynthesis of said precursors, and their uses, are also disclosed.			
(57) Abrégé			
La présente invention se rapporte à de nouveaux composés apparentés aux streptogramines du groupe B, de formule générale (I) et à un procédé de préparation de streptogramines par mutasynthèse mettant en œuvre un micro-organisme muté de manière à altérer la biosynthèse d'au moins un des précurseurs des streptogramines du groupe B. Elle concerne également des nouvelles séquences nucléotidiques impliquées dans la biosynthèse de ces précurseurs et leurs utilisations.			
<p style="text-align: right;">(I)</p>			

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	GB	Royaume-Uni	MR	Mauritanie
AU	Australie	GE	Géorgie	MW	Malawi
BB	Barbade	GN	Guinée	NE	Niger
BE	Belgique	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	HU	Hongrie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IT	Italie	PL	Pologne
BR	Brésil	JP	Japon	PT	Portugal
BY	Bélarus	KE	Kenya	RO	Roumanie
CA	Canada	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CF	République centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CN	Chine	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LV	Lettonie	TG	Togo
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DE	Allemagne	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
FR	France			VN	Viet Nam
GA	Gabon				

Streptogramines et procédé de préparation de streptogramines par mutasynthèse

La présente invention se rapporte principalement à de nouveaux composés apparentés aux streptogramines du groupe B et à un procédé de préparation par 5 mutasynthèse de streptogramines. Elle concerne également de nouveaux gènes impliqués dans la biosynthèse de précurseurs des streptogramines du groupe B ainsi que leurs utilisations.

Les streptogramines forment un groupe homogène d'antibiotiques constitués 10 d'une association de deux types de molécules chimiquement différentes; d'une part des macrolactones polyinsaturées (composants du groupe A), et d'autre part des depsipeptides (composants du groupe B). Ce groupe comprend de nombreux antibiotiques connus sous différents noms en fonction de leur origine, dont les pristinamycines, les mikamycines, les virginiamycines (Cocito 1979, 1983).

15 Les composants A et B ont une activité antibactérienne synergique qui peut atteindre 100 fois celle des composants séparés et qui, contrairement à celle de chaque composant, est bactéricide (Cocito 1979). Cette activité est plus particulièrement efficace contre les bactéries Gram-positifs, comme les staphylocoques et les streptocoques (Cocito 1979, Videau 1982). Les composants A 20 et B inhibent la synthèse protéique en se fixant à la sous-unité 50S du ribosome (Cocito 1979 ; Di Giambattista *et al.* 1989).

La connaissance des voies de biosynthèse de chacun des composants reste partielle à ce jour, bien que des études précédentes, présentées dans la demande de brevet PCT/FR93/0923, aient permis d'identifier plusieurs protéines et les gènes de 25 structure correspondants, impliqués dans la biosynthèse des deux types de composants.

Dans le processus de biosynthèse des streptogramines du groupe B, deux parties peuvent être distinguées:

30 1) Biosynthèse des précurseurs, ou de leurs analogues, du macrocycle: acide 3-hydroxypicolinique, acide L-2-aminobutyrique, 4-diméthylamino-L-phénylalanine, acide-L-pipécolique, L-phénylglycine.

35 2) Formation du macrocycle à partir des précurseurs cités ci-dessus, de la L-thréonine et de la L-proline, ou de leurs analogues, avec éventuellement modification(s) subséquente(s), de type N-méthylation peptidique, épimérisation, hydroxylation et oxydation.

La demande de brevet PCT/FR93/0923, a notamment pour objet les enzymes catalysant l'incorporation des précurseurs dans la chaîne peptidique des streptogramines B en cours d'elongation ainsi que leurs gènes de structure. Ces résultats ont permis de mettre en évidence le caractère de synthèse peptidique non 5 ribosomale des composants de type B.

La présente invention concerne plus particulièrement de nouveaux composés apparentés aux streptogramines du groupe B et plus précisément des nouveaux composés de la famille des pristinamycines I (figures 1 et 2), désignés ci-après par PI, ou de la famille des virginiamycines S (figure 3).

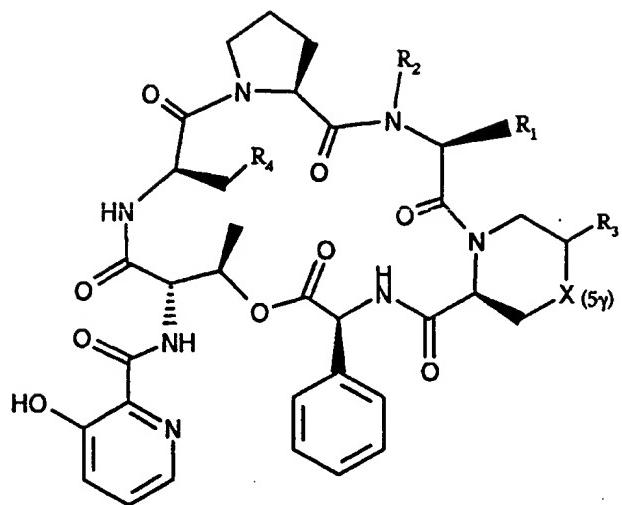
10 Le constituant majoritaire des pristinamycines I (PI) est la PI_A (figure 1) qui représente environ 94 % des PI, les environ 6 % restant étant représentés par des constituants minoritaires du depsipeptide (PI_B à PI_J) dont les structures sont représentées en figure 2. La PI résulte essentiellement de la condensation d'acides aminés dont certains sont indispensables pour la synthèse protéique (thréonine et proline) et dont d'autres sont originaux et considérés eux-mêmes comme des 15 métabolites secondaires (acide L-2-aminobutyrique, 4-diméthylamino-L-phénylalanine (DMPAPA), acide L-pipécolique et L-phénylglycine pour la PI_A) ainsi que d'un précurseur aromatique, l'acide 3-hydroxypicolinique.

En ce qui concerne les dérivés de virginiamycines S, ils résultent de la 20 condensation des mêmes acides que pour la PI à l'exception de la DMPAPA qui est remplacée par une phénylalanine (voir figure 3).

La production de ces différents composés par biosynthèse nécessite donc la synthèse préalable, par la souche productrice, des précurseurs originaux identifiés ci-dessus.

25 La présente invention résulte précisément d'un procédé de préparation original de streptogramines qui met en oeuvre, à titre de souche productrice de streptogramines, une souche de microorganisme mutée de manière à altérer la biosynthèse des précurseurs de streptogramines du groupe B. Selon ce procédé, ladite souche mutante est cultivée dans un milieu complémenté par un précurseur original, 30 différent du précurseur dont la biosynthèse est altérée. De manière inattendue, il s'en suit une production de nouveaux composés apparentés aux streptogramines du groupe B, intéressants sur le plan thérapeutique.

Plus précisément, la présente invention se rapporte à de nouveaux composés représentés par la formule générale I:

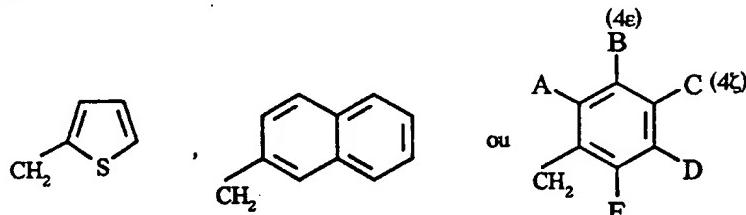


I

dans laquelle :

- 5 -R₂ et R₄ représentent, indépendamment l'un de l'autre, un atome d'hydrogène ou un groupement méthyle,
 -R₃ représente un atome d'hydrogène ou un groupement hydroxyle,
 -X représente un groupement CO, CHOH ou CH₂ et
 -R₁ représente:

10



avec

- pour les dérivés méta :

- A, C, D et E représentant un atome d'hydrogène et
 15 B pouvant représenter:
 - un halogène et de préférence un atome de fluor,
 - un groupement monoalkylamino ou dialkylamino avec alkyle représentant de préférence un groupement méthyle ou éthyle,

-un groupement éther. Il s'agit plus particulièrement d'un groupement OR avec R choisi de préférence parmi les groupements méthyle, éthyle, trifluorométhyle et allyle,

- 5 -un groupement thioéther représenté de préférence par un groupement alkylthio avec de préférence alkyle représentant un groupement méthyle,
 -un groupement alkyle en C₁ à C₃ ou
 -un groupement trihalogénométhyle et de préférence le trifluorométhyle.

- pour les dérivés para :

- 10 A, B, D et E représentant un atome d'hydrogène et C pouvant représenter:
 - un halogène,
 -un groupement NR₁R₂ avec R₁ et R₂ représentant indépendamment l'un de l'autre un groupement choisi parmi
 15 - l'hydrogène,
 - un groupement alkyle en C₁ à C₄ linéaire ou ramifié avec lorsque l'un des substituants R₁ ou R₂ représente un groupement méthyle, l'autre représente obligatoirement un groupement éthyle,
 - un groupement alkyl-cycloalkylméthyle avec un cycloalkyle en C₃ à C₄
 20 - un groupement cycloalkyle en C₃ à C₄ éventuellement substitué,
 -un groupement alcényle en C₃ à C₄ linéaire ou ramifié avec lorsque l'un des substituants, R₁ ou R₂, représente un groupement alcényle, l'autre est différent d'un groupement méthyle ou d'un cycloalkyle en C₃ à C₆,
 - un groupement N-pyrrolidinyle substitué ou non,
 25 -un groupement éther, il s'agit de préférence d'un groupement OR avec R choisi de préférence parmi les groupements méthyle, éthyle éventuellement substitué par un atome de chlore, trifluorométhyle et alcényle .
 -un groupement thioéther représenté de préférence par un groupement alkylthio avec de préférence alkyle représentant un groupement alkyle en C₁ à C₃.
 30 -un groupement acyle ou alcoxycarbonyle et plus particulièrement un groupement COR avec R représentant de préférence un groupement alkyle en C₁ à C₃ ou un groupement alkoxy en C₁ à C₃.
 -un groupement alkyle en C₁ à C₆, linéaire ou ramifié, et de préférence choisi parmi les groupements méthyle, isopropyle et tert-butyle,
 35

- un groupement alkylthiométhyl et plus préférentiellement un groupement CH₂SR avec R représentant de préférence un groupement alkyle en C₁ à C₃
- un groupement aryle et de préférence un phényle ou
- un groupement trihalogénométhyle et de préférence le trifluorométhyle.

5

- pour les dérivés disubstitués méta-para :

A, D et E représentant un atome d'hydrogène et

B pouvant représenter:

- un halogène et de préférence un atome de fluor,

10 -un groupement monoalkylamino ou dialkylamino avec alkyle représentant de préférence un groupement méthyle ou éthyle,

-un groupement éther et de préférence un groupement OR avec R choisi de préférence parmi les groupements méthyle, éthyle et trifluorométhyle,

- un groupement thioéther et de préférence alkylthio avec alkyle représentant

15 préférentiellement un groupement éthyle, ou

- un groupement alkyle en C₁ à C₃ et

C pouvant représenter:

- un halogène et de préférence un atome de fluor,

20 -un groupement amino, monoalkylamino ou dialkylamino avec alkyle représentant de préférence un groupement méthyle à la condition que B soit différent d'un atome de brome ou de chlore, ou un groupement allyle substitué ou non,

- un groupement éther et de préférence un groupement OR avec R choisi de préférence parmi les groupements méthyle, éthyle et trifluorométhyle,

25 -un groupement thioéther et de préférence un groupement alkylthio avec de préférence alkyle représentant un groupement méthyle,

- un groupement alkyle en C₁ à C₆ ou

- un groupement trihalogénométhyle et de préférence le trifluorométhyle et

30 - pour les dérivés disubstitués ortho-para :

B, E et D représentant un atome d'hydrogène et A et C, un groupement méthyle.

A titre de composés préférés, on peut plus particulièrement citer:

la 4 ζ -méthylthio-dés(4 ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A,

35 la 4 ζ -méthylthio-dés(4 ζ -diméthylamino) pristinamycine I_H.

- la 5γ -hydroxy 4ζ -méthylthio-dés(4ζ -diméthylamino) pristinamycine I_H,
 la 4ζ -méthyl-dés(4ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A,
 la 4ζ -méthyl-dés(4ζ -diméthylamino) pristinamycine I_H,
 la 4ζ -méthoxy-dés(4ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A,
 5 la 4ζ -méthoxycarbonyl-dés(4ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A,
 la 4ζ -chloro-dés(4ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A,
 la 4ζ -bromo-dés(4ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A,
 la 4ζ -bromo-dés(4ζ -diméthylamino) pristinamycine I_H,
 la 4ζ -ido-dés(4ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A,
 10 la 4ζ -ido-dés(4ζ -diméthylamino) pristinamycine I_H,
 la 4ζ -trifluorométhyl-dés(4ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A,
 la 4ζ -trifluorométhyl-dés(4ζ -diméthylamino) pristinamycine I_H,
 la 4ζ -tert-butyl-dés(4ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A,
 la 4ζ -isopropyl-dés(4ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A,
 15 la 4ζ -isopropyl-dés(4ζ -diméthylamino) pristinamycine I_E.
 la 4ϵ -méthylamino-dés(4ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A,
 la 4ϵ -méthoxy-dés(4ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A,
 la 4ϵ -méthoxy-dés(4ζ -diméthylamino) pristinamycine I_H,
 la 4ϵ -fluoro 4ζ -méthyl-dés(4ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A,
 20 la 4ζ -amino-dés(4ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A,
 la 4ζ -éthylamino-dés(4ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A,
 la 4ζ -diéthylamino-dés(4ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A,
 la 4ζ -allylamino-dés(4ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A,
 la 4ζ -diallylamino-dés(4ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A,
 25 la 4ζ -allyl éthylamino-dés(4ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A,
 la 4ζ -éthyl propylamino-dés(4ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A,
 la 4ζ -éthyl isopropylamino-dés(4ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A,
 la 4ζ -éthyl méthylcyclopropylamino-dés(4ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A,
 la 4ζ -(1-pyrrolidinyl)-dés(4ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A,
 30 la 4ζ -trifluorométhoxy-dés(4ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A,
 la 4ζ -allyloxy-dés(4ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A,
 la 4ζ -éthoxy-dés(4ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A

- la 4ζ -éthylthio-dés(4ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A
la 4ζ -méthylthiométhyl-dés(4ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A
la 4ζ -(2-chloroéthoxy)-dés(4ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A
la 4ζ -acétyl-dés(4ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A
5 la 4ζ -éthyl-dés(4ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A
la 4ζ -éthyl-dés(4ζ -diméthylamino) pristinamycine I_H
la 4ϵ -diméthylamino-dés(4ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A
la 4ϵ -méthylthio-dés(4ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A
la 4ϵ -éthoxy-dés(4ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A
10 .

La présente invention vise également un procédé notamment utile pour préparer les composés de formule générale I.

Plus précisément, elle se rapporte à un procédé pour préparer des streptogramines caractérisé en ce qu'il met en oeuvre une souche d'un microorganisme producteur de streptogramines, possèdant au moins une modification génétique affectant la biosynthèse d'un précurseur des streptogramines du groupe B et en ce que ladite souche mutante est cultivée dans un milieu de culture adéquat et complémenté avec au moins un précurseur original, autre que celui dont la biosynthèse est altérée et en ce que l'on récupère lesdites streptogramines.

Les souches mises en oeuvre dans le cadre de la présente invention sont donc des souches productrices de streptogramines, mutées. La ou lesdites modifications génétiques peuvent être localisées soit au niveau d'un des gènes impliqués dans la biosynthèse desdits précurseurs soit en dehors de la région codante, par exemple dans les régions responsables de l'expression et/ou de la régulation transcriptionnelle ou post-transcriptionnelle desdits gènes ou dans une région appartenant au transcript contenant lesdit gène.

Selon un mode particulier de l'invention, les souches mutantes possèdent une ou plusieurs modifications génétiques au niveau d'au moins un de leurs gènes impliqués dans la biosynthèse des précurseurs des streptogramines du groupe B.

Cette ou ces modifications génétiques altèrent l'expression dudit gène c'est à dire rendent ce gène, et le cas échéant un autre des gènes impliqués dans la biosynthèse des précurseurs, partiellement ou totalement incapable de coder pour l'enzyme naturelle impliquée dans la biosynthèse d'au moins un précurseur.

L'incapacité desdits gènes à coder pour les protéines naturelles peut se manifester soit par la production d'une protéine inactive en raison de modifications structurales ou conformationnelles, soit par l'absence de production, soit par la production d'une protéine ayant une activité enzymatique altérée, ou encore par la production de la 5 protéine naturelle à un niveau atténué ou selon un mode de régulation désiré. L'ensemble de ces manifestations possibles se traduit par une altération voire un blocage au niveau de la synthèse d'au moins l'un des précurseurs des streptogramines du groupe B.

Les gènes, susceptibles d'être mutés dans le cadre de la présente invention, sont 10 de préférence les gènes impliqués dans la biosynthèse des précurseurs suivants: acide L-2-aminobutyrique, 4-diméthylamino-L-phénylalanine (DMPAPA), acide L-pipécolique, L-phénylglycine et/ou l'acide 3-hydroxypicolinique (3-HPA).

Il s'agit plus préférentiellement des gènes papA, papM, papB (SEQ ID N°3), papC (SEQ ID N°2), hpaA (SEQ ID N°8), snbF (SEQ ID N°6) et pipA (SEQ ID N°5) décrits ci-après.

En ce qui concerne les gènes papA et papM, ils ont déjà été décrits dans la demande de brevet PCT/FR93/0923. Ils sont présents sur le cosmid pIBV2. Le gène papA semble correspondre à un gène de biosynthèse de la 4-amino-L-phénylalanine à partir du chorismate. La 4-amino-L-phénylalanine est ensuite diméthylée par le 20 produit du gène papM, une N-méthyltransférase, pour former la 4-diméthylamino-L-phénylalanine, DMPAPA, qui est ensuite incorporée dans la pristinamycine I_A. Ces deux gènes interviennent donc plus particulièrement au niveau de la synthèse du précurseur dit DMPAPA.

En ce qui concerne les autres gènes papB, papC, pipA, snbF et hpaA, ils ont été 25 identifiés et caractérisés dans le cadre de la présente invention. Ils sont regroupés avec les gènes snbA, papA, et papM sur une région chromosomique d'environ 10 kb (figure 7).

Les homologies de séquences mises en évidence pour les protéines PapB et PapC, montrent que ces protéines sont également impliquées dans la biosynthèse du 30 précurseur DMPAPA, conjointement avec les protéines PapA et PapM. Les deux nouveaux gènes correspondants, papB et papC, ont été isolés et identifiés par sous-clonages effectués à partir du cosmid pIBV2, décrit dans la demande de brevet PCT/FR93/0923 et d'un plasmide pVRC900, dérivé de pIBV2 par une délétion HindIII, également décrit dans la demande de brevet PCT/FR93/0923.

La comparaison de la protéine codée par le gène papC, avec les séquences protéiques contenues dans la banque Genpro fait apparaître une homologie de 27 % avec la région impliquée dans l'activité préphénate déhydrogénase des protéines bifonctionnelles TyrA d'E. coli (Hudson et Davidson, 1984) et d'Erwinia herbicola (EMBL data library, 1991). Cette région de TyrA catalyse l'aromatisation du préphénate en 4-hydroxyphénylpyruvate dans la biosynthèse de la tyrosine. Une aromatisation similaire à partir du 4-déoxy 4-amino préphénate conduisant au 4-amino phénylpyruvate intervient très vraisemblablement dans la synthèse de la DMPAPA. Elle serait catalysée par la protéine PapC (SEQ ID n°2).

Quant à la protéine PapB, elle possède une homologie de 24 à 30 % avec la région impliquée dans l'activité chorismate mutase des protéines bifonctionnelles TyrA et PheA d'E. coli (Hudson et Davidson, 1984) et de la protéine TyrA d'Erwinia herbicola. Cette région catalyse l'isomérisation du chorismate en préphénate dans la biosynthèse de la tyrosine et de la phénylalanine. La protéine PapB (SEQ ID n°3) intervient vraisemblablement au niveau de l'isomérisation similaire à partir du 4-déoxy 4-amino chorismate conduisant au 4-déoxy 4-aminopréphénate dans la synthèse de la DMPAPA.

En ce qui concerne les gènes pipA, snbF et hpaA, ils ont été localisés dans les régions contenues entre le gène snbA codant pour l'acide 3-hydroxypicolinique AMP ligase, décrite dans la demande de brevet PCT/FR93/0923 et les gènes papA ou snbR. Ils ont précisément été localisés par sous-clonages effectués à partir du plasmide pVRC900 et du cosmide pIBV2, décrits dans la demande de brevet PCT/FR93/0923.

En comparant la protéine codée par le gène hpaA et les séquences protéiques contenues dans la banque Genpro, il a été mis en évidence une homologie de 30 à 40 % avec un groupe de protéines probablement impliquées (Thorson et al., 1993) dans la transamination d'intermédiaires de biosynthèse de différents antibiotiques (DnrJ, EryC1, TylB, StrS, PrgL). La synthèse du précurseur 3-HPA qui semble dériver de la lysine par une autre voie que la cyclodéamination (voir exemples 1-2 et 2-1), nécessite vraisemblablement une étape de transamination susceptible d'être catalysée par le produit de ce gène appelé hpaA (SEQ ID n°8). Les résultats de mutation réalisée dans ce gène montrent par ailleurs sans équivoque l'implication de ce gène dans la synthèse du précurseur 3-HPA.

La comparaison du produit codé par le gène dit pipA avec les séquences protéiques contenues dans la banque Genpro fait apparaître une homologie de 30 % avec l'ornithine cyclodéaminase d'Agrobacterium tumefaciens (Schindler et al.,

1989). Cette enzyme intervient dans la dernière étape du catabolisme de l'octopine; elle convertit la L-ornithine en L-proline par cyclo-déamination. Des auteurs ont montré par incorporation de lysine marquée, que l'acide 4-oxopipécolique et l'acide 3-hydroxypicolinique, retrouvés aussi bien dans la PI_A que dans la virginiamycine 5 S1, dérivaient de la lysine (Molinero *et al.*, 1989; Reed *et al.*, 1989). Une réaction de cyclodéamination de la lysine similaire à celle décrite pour l'ornithine conduirait à la formation d' acide pipécolique. En tenant compte de cette hypothèse ce produit a été appelé PipA (SEQ ID n° 5). Les résultats de mutation dans le gène pipA, présentés dans les exemples ci-après, montrent l'implication du gène pipA dans la seule 10 synthèse de l'acide pipécolique. On note en particulier que cette mutation n'affecte pas la biosynthèse de l'acide 3-hydroxypicolinique, qui dérive aussi de la lysine et dont l'acide pipécolique aurait pu être un précurseur.

Enfin, en comparant le produit du gène dit snbF avec les séquences protéiques contenues dans la banque Genpro, il a été noté une homologie de 30 à 40 % avec 15 plusieurs hydroxylases de type cytochrome P450, impliquées dans la biosynthèse de métabolites secondaires (Omer *et al.*, 1990. Trower *et al.*, 1992). Plusieurs hydroxylations sont envisageables dans la biosynthèse des précurseurs de la pristinamycine I, notamment au niveau de la biosynthèse du 3-HPA (hydroxylation en 3 de l'acide picolinique) et de l'acide 4-oxopipécolique (hydroxylation en 4 de 20 l'acide pipécolique). La protéine correspondante a été appelée SnbF (SEQ ID n°6).

Les résultats de mutation dans le gène pipA, avec des effets polaires sur l'expression du gène snbF, montrent l'implication du gène snbF dans l'hydroxylation du résidu acide pipécolique des streptogramines du groupe B. C'est ainsi que l'expression du gène snbF est altérée par le biais d'une modification génétique au 25 niveau du gène pipA.

Préférentiellement, la ou les modifications génétiques rendent l'édit gène partiellement ou totalement incapable de coder pour la protéine naturelle.

Par modification génétique, on doit entendre plus particulièrement toute suppression, substitution, délétion, ou addition d'une ou plusieurs bases dans le ou les 30 gènes considérés. De telles modifications peuvent être obtenues *in vitro* (sur de l'ADN isolé) ou *in situ*, par exemple, au moyens des techniques du génie génétique, ou encore en exposant lesdits microorganismes à un traitement au moyen d'agents mutagènes. Par agents mutagènes, on peut citer par exemple les agents physiques tels que les rayonnements énergétiques (rayons X, γ , ultra violet, etc..), ou les agents 35 chimiques capables de réagir avec différents groupements fonctionnels des bases de

l'ADN, et par exemple les agents alkylants [éthylméthane sulfonate (EMS), N-méthyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, N-nitroquinoléine-1-oxyde (NQO)], les agents bialkylants, les agents intercalants, etc... Par délétion, on entend toute suppression d'une partie ou de la totalité du gène considéré. Il peut s'agir notamment d'une partie 5 de la région codant pour lesdites protéines, et/ou de tout ou partie de la région promotrice de la transcription, de la traduction ou encore du transcript.

Les modifications génétiques peuvent également être obtenues par disruption génique, par exemple selon le protocole initialement décrit par Rothstein [Meth. Enzymol. 101 (1983) 202] ou avantageusement par double recombinaison 10 homologue. Dans ce cas, l'intégralité de la séquence codante sera préférentiellement perturbée pour permettre le cas échéant, le remplacement, par recombinaison homologue, de la séquence génomique sauvage par une séquence non fonctionnelle ou mutante.

Selon une autre alternative de l'invention, les modifications génétiques 15 peuvent consister à placer le ou les gènes codant pour lesdites protéines sous contrôle d'un promoteur régulé.

Les souches de microrganismes mutantes selon la présente invention peuvent être obtenues à partir de tout microorganisme producteur de streptogramines (Cf. tableau V). Selon un mode de réalisation particulier de l'invention, il s'agit 20 d'une souche dérivant de *S. pristinaespiralis* et plus particulièrement de *S. pristinaespiralis* SP92.

A titre de souche mutante préférée dans le cadre de la présente invention, on peut plus particulièrement citer la souche SP92::pVRC508, mutée dans la biosynthèse du précurseur DMPAPA par disruption par simple crossing-over du gène *papA* ou 25 encore plus préférentiellement la souche SP212, mutée dans la biosynthèse du précurseur DMPAPA par disruption du gène *papA* par double recombinaison homologue. Ces souches ne produisent plus de PI sauf lorsqu'elles sont complémentées par le précurseur DMPAPA. De manière inattendue, lorsqu'un précurseur original, différent de la DMPAPA et capable après, le cas échéant, 30 métabolisation, d'être incorporé par la PI synthétase III (protéine SnbD responsable de l'incorporation des résidus L-proline et DMPAPA) est ajouté au milieu de production, ces deux souches deviennent capables de produire de nouvelles pristinamycines I ou virginiamycines ou de produire majoritairement un composant normalement minoritaire de la PI, notamment la PI_B (figure 2).

Dans le cadre de la présente invention, deux autres souches mutantes ont été préparées. Il s'agit respectivement de la souche SP92_{pipA::QamR} disruptée dans le gène pipA par recombinaison homologue et la souche SP92_{hpaA::QamR} disruptée dans le gène hpaA. La souche SP92_{pipA::QamR} d'une part, ne produit plus de PI
5 dans les conditions standards de fermentation et d'autre part, en présence d'acide L-pipécolique, permet la forte production d'un composant initialement minoritaire des composants B des streptogramines dans lesquels l'acide 4-oxopipécolique est remplacé par l'acide L-pipécolique. Quant à la souche S. pristinaespiralis SP92_{hpaA::QamR}, elle ne produit plus de PI dans les conditions standards de fermentation mais
10 est capable de produire de nouvelles streptogramines du groupe B, en présence de précurseurs originaux.

En complémentant le milieu de culture de souches mutantes selon l'invention, avec au moins un précurseur original, il s'avère possible d'orienter la biosynthèse soit vers de nouvelles streptogramines, soit vers une forme minoritaire d'entre elles, ou
15 encore de privilégier la formation d'une d'entre elles.

Les précurseurs mis en oeuvre dans le cadre de la présente invention peuvent être des dérivés ou analogues d'acides aminés et plus particulièrement de la phénylalanine ainsi que d'acides organiques et notamment d'acides alpha-céto-carboxyliques et plus particulièrement des dérivés d'acide phénylpypyruvique.

20 Bien entendu, le précurseur original est tel qu'il pourvoit à l'altération voire le blocage, induit selon l'invention, au niveau de la biosynthèse d'un des précurseurs naturels des streptogramines du groupe B et conduit à la synthèse de streptogramines. Selon un mode particulier de l'invention, ce précurseur original est choisi de manière à être apparenté au précurseur dont la biosynthèse est altérée. Ainsi dans le cas
25 particulier de mutant bloqué dans la biosynthèse du DMPAPA, le précurseur original est de préférence un dérivé de phénylalanine.

A titre de précurseurs convenant à l'invention, on peut notamment citer les suivants:

Phénylalanine, 4-diméthylaminophénylalanine, 4-méthylaminophénylalanine,
30 4-aminophénylalanine, 4-diéthylaminophénylalanine, 4-éthylaminophénylalanine, 4-méthylthiophénylalanine, 4-méthylphénylalanine, 4-méthoxyphénylalanine, 4-trifluorométhoxyphénylalanine, 4-méthoxycarbonylphénylalanine, 4-chlorophénylalanine, 4-bromophénylalanine, 4-iodophénylalanine,
4-trifluorométhylphénylalanine, 4-tert-butylphénylalanine, 4-isopropylphénylalanine,
35 3-méthylaminophénylalanine, 3-méthoxyphénylalanine, 3-méthylthiophénylalanine,

- 3-fluoro 4-méthylphénylalanine, acide L-pipécolique, acide 4-tert-butylphénylpyruvique, acide 4-méthylaminophénylpyruvique, 2-naphtylphénylalanine, 4-fluorophénylalanine, 3-fluorophénylalanine, 3-éthoxyphénylalanine, 2,4-diméthylphénylalanine, 3,4-diméthylphénylalanine, 3-méthylphénylalanine, 4-phénylephénylalanine, 4-butylphénylalanine, 2-thiényle-3-alanine, 3-trifluorométhylphénylalanine, hydroxyphénylalanine, 3-éthylaminophénylalanine 4- allylaminophénylalanine, 4-diallylaminophénylalanine, 4- allyl éthylaminophénylalanine, 4- éthyl propylaminophénylalanine, 4- éthyl isopropylaminophénylalanine, 4- éthyl méthylcyclopropylaminophénylalanine, 4-(1-pyrrolidinyl) phénylalanine, 4-O-allyltyrosine, 4-O-éthyltyrosine, 4-éthylthiophénylalanine, 4-éthylthiométhylphénylalanine, 4-O-(2-chloroéthyl) tyrosine, 4-acétyl phénylalanine, 4-éthyl phénylalanine, 3-diméthylaminophénylalanine, 3-éthoxy phénylalanine, 3-fluoro4-méthylphénylalanine et 4-aminométhylphénylalanine.
- 15 Parmi ces précurseurs, les 4-trifluorométhoxyphénylalanine, 3-méthylaminophénylalanine, 3-méthylthiophénylalanine, 3-fluoro4-méthylphénylalanine, l'acide 4-méthylaminophénylpyruvique, 3-éthoxyphénylalanine, 4- allylaminophénylalanine, 4- diallylaminophénylalanine, 4-allyl éthylaminophénylalanine, 4- éthyl propylaminophénylalanine, 4- éthyl isopropylaminophénylalanine, 4-éthylméthyl-cyclopropylaminophénylalanine, 4-(1-pyrrolidinyl) phénylalanine, 4-éthylthiométhylphénylalanine, 4-O-(2-chloroéthyl) tyrosine, 3-diméthylaminophénylalanine et 3-éthylaminophénylalanine sont nouveaux et ont été préparés et caractérisés dans le cadre de la présente invention. Ils se révèlent particulièrement utiles pour préparer des streptogramines selon l'invention.
- 20 Le procédé revendiqué s'avère particulièrement intéressant pour préparer de nouvelles streptogramines du groupe B ou encore pour privilégier la formation de certaines d'entre elles. A ce titre il est tout particulièrement utile pour préparer la PIB.
- 30 La présente invention a également pour objet une séquence nucléotidique choisie parmi :
- (a) tout ou partie des gènes papC (SEQ ID n° 2), papB (SEQ ID n° 3), pipA (SEQ ID n° 5), snbF (SEQ ID n° 6) et hpaA (SEQ ID n° 8),
 - (b) les séquences hybrideant avec tout ou partie des gènes (a) et,

(c) les séquences dérivées des séquences (a), et (b) en raison de la dégénérescence du code génétique.

Dans le cas particulier des séquences hybrides selon (b), elles codent de préférence pour un polypeptide impliqué dans la biosynthèse des streptogramines.

5 Encore plus préférentiellement, l'invention a pour objet les séquences nucléotidiques représentées par les gènes papC (SEQ ID n° 2), papB (SEQ ID n° 3), pipA (SEQ ID n° 5), snbF (SEQ ID n° 6) et hpaA (SEQ ID n° 8).

10 Un autre objet de l'invention concerne tout ADN recombinant comprenant un gène papC (SEQ ID n° 2), papB (SEQ ID n° 3), pipA (SEQ ID n° 5), snbF (SEQ ID n° 6) et hpaA (SEQ ID n° 8).

15 Bien entendu, les séquences nucléotidiques définies ci-dessus peuvent faire partie d'un vecteur de type vecteur d'expression qui peut être à réPLICATION AUTONOME ou intégratif ou vecteur suicide. La présente invention vise également ces vecteurs ainsi que toute utilisation d'une séquence selon l'invention ou d'un vecteur correspondant notamment pour la préparation de métabolites d'intérêt. Elle se rapporte en outre à tout polypeptide résultant de l'expression d'une séquence revendiquée.

20 La présente invention concerne également toute souche S. pristinaespiralis mutée qui possède au moins une modification génétique au niveau d'un des gènes papC (SEQ ID n° 2), papB (SEQ ID n° 3), pipA (SEQ ID n° 5), snbF (SEQ ID n° 6) et hpaA (SEQ ID n° 8) et plus préférentiellement les souches SP92pipA::Ωam^R, SP92hpaA::Ωam^R ainsi que toute souche S. pristinaespiralis possédant une modification génétique consistant en une disruption du gène papA par double recombinaison homologue telle que SP212.

25 Les associations d'un composant des streptogramines du groupe A et d'un composé de formule générale I, selon l'invention, constituent des compositions particulièrement intéressantes sur le plan thérapeutique. Elles sont notamment employées pour les traitements d'affections dues à des bactéries Gram-positifs (du genre Staphylocoques, Streptocoques, Pneumocoques, Entérocoques) et Gram-négatifs (du genre Haemophilus, Gonocoques, Méningocoques). C'est ainsi que les composés selon l'invention synergisent l'action antibactérienne de la pristinamycine IIIB sur *Staphylococcus aureus* IP8203 *in vivo* chez la souris, à des doses

principalement comprises entre 30mg/kg et 100mg/kg par voie orale, lorsqu'ils sont associés dans des proportions PI /PII de l'ordre de 30/70.

La présente invention s'étend à toute composition pharmaceutique contenant au moins un composé de formule générale I en association ou non avec une streptogramine du groupe A.
5

Les exemples figurant ci-après sont présentés à titre illustratif et non limitatif de la présente invention.

10 **LI**ST**E** DES FIGURES.****

Figure 1 : Structure de la pristinamycine IA.

Figure 2 : Structure des composants minoritaires de la pristinamycine I.

Figure 3 : Autres exemples de structures de composants B des streptogramines.

Figure 4 : Représentation de la région PstI-XbaI de 2,9 kb.

15 Figure 5 : Représentation de la région XbaI-PstI de 4,5 kb.

Figure 6 : Représentation de la région HindIII-BglII de 1,6 kb.

Figure 7 : Représentation de la région BglII-XbaI d'environ 10 kb.

Figure 8 : Représentation du plasmide pVRC415.

Figure 9 : Représentation du plasmide pVRC420.

20 Figure 10 : Représentation du plasmide pVRC411.

Figure 11 : Représentation du plasmide pVRC421.

Figure 12: Représentation du plasmide pVRC414.

Figure 13: Stratégie de construction de SP212.

25 **EXAMPLE 1: Séquençage et identification de gènes impliqués dans la biosynthèse de la pristinamycine I et de ses précurseurs.**

Identification par séquençage des gènes situés en aval et en amont du gène codant pour l'enzyme PapA décrite dans le brevet PCT/FR93/0923, ainsi que d'un

30 gène situé en aval du gène codant pour l'enzyme SnbA, également décrite dans le brevet PCT/FR93/0923.

Cet exemple décrit comment à partir du cosmide pIBV2, décrit dans le brevet PCT/FR93/0923, et contenant les gènes de structure des enzymes PapA et PapM, intervenant dans la synthèse du précurseur 4-diméthylamino-L-phénylalanine

35 (DMPAPA) de la pristinamycine I et le gène de structure de l'enzyme SnbA

responsable de l'activation du précurseur aromatique de la pristinamycine I, l'acide 3-hydroxypicolinique (3-HPA), il s'est avéré possible d'identifier par séquençage autour de ces gènes et étude des mutants correspondants, d'autres gènes impliqués dans la biosynthèse du précurseur DMPAPA, ou dans la biosynthèse d'autres précurseurs de la pristinamycine I.

Dans ce but, des sous-clonages ont été effectués à partir du cosmid pIBV2, et du plasmide pVRC900, dérivé de pIBV2 par une délétion HindIII, et également décrit dans le brevet PCT/FR93/0923.

Cet exemple illustre comment les séquences nucléotidiques de fragments situés en aval et en amont des gènes papA et snbA de S. pristinaespiralis peuvent être obtenues.

Les techniques de clonage des fragments d'ADN d'intérêt dans les vecteurs M13mp18/19 (Messing et al., 1981) sont les techniques classiques de clonage dans Escherichia coli et sont décrites dans Maniatis et al. (1989).

15

1-1 Séquençage et analyse de la région en aval du gène papA.

Pour séquencer cette région, contenue entre les gènes papA et papM, les fragments PstI-PstI de 1,5 kb, PstI-XhoI de 0,7 kb et XhoI-XhoI de 0,7 kb ont été sous-clonés dans les vecteurs M13mp18 et M13mp19 à partir du plasmide pVRC900. Les sites de clonages ont été traversés par séquençage sur ADN double brin, en utilisant les plasmides pVRC900 et pVRC409 décrits dans le brevet PCT/FR93/0923. Les clonages ont été réalisés comme suit. Environ 2 µg du plasmide pVRC900 ont été coupés par les enzymes de restriction PstI et/ou XhoI (New England Biolabs) dans les conditions préconisées par le fournisseur. Les fragments de restrictions ainsi obtenus ont été séparés sur gel d'agarose 0,8% et les fragments d'intérêt, PstI-PstI de 1,5 kb, PstI-XhoI de 0,7 kb et XhoI-XhoI de 0,7 kb ont été isolés et purifiés par Geneclean (Bio101, La Jolla, Californie). Pour chaque clonage, environ 10 ng de M13mp19 et/ou M13mp18 coupés par PstI et/ou XhoI, ont été ligaturés avec 100 ng du fragment à cloner, dans les conditions décrites par Maniatis et al. 1989. Après transformation de la souche TG1 (K12, $\Delta(lac-pro)$ supE thi hsd ΔS F' traD36 proA⁺B⁺ lacI^q lacZ $\Delta M 15$; Gibson, 1984) et sélection des plages de lyse sur milieu LB + X-gal + IPTG, selon la technique décrite par Maniatis et al. (1989), les phages portant les fragments souhaités ont été isolés. Les différents inserts ont été séquencés

par la méthode de réaction de terminaison de chaîne en utilisant comme amorce de synthèse le primer universel ou des oligonucléotides synthétiques et complémentaires d'une séquence de 20 nucléotides de l'insert à séquencer. Les réactions ont été faites en utilisant des didéoxynucléotides fluorescents (PRISM Ready Reaction DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit-Applied Biosystem) et analysées sur un séquenreur d'ADN de type Applied Biosystems Model 373A. Le recouvrement entre ces différents inserts a permis d'établir la séquence nucléotidique totale présente entre les gènes papA et papM (SEQ ID N°1).

A partir de cette séquence nucléotidique, il est possible de déterminer les phases 10 ouvertes de lecture et d'identifier ainsi des gènes impliqués dans la biosynthèse de la PI ou de ses précurseurs chez S. pristinaespiralis ainsi que les polypeptides codés par ces gènes.

Nous avons recherché la présence de phases ouvertes de lecture au sein du fragment PstI-XhoI de 2,9 kb contenant la séquence nucléotidique entre les gènes 15 papA et papM, en utilisant le fait que l'ADN des Streptomyces présente un haut pourcentage en bases G et C ainsi qu'un fort biais dans l'usage des codons qui composent les phases codantes (Bibb *et al.* 1984). La méthode de Staden et Mc Lachlan (1982) permet de calculer la probabilité des phases codantes en fonction de 20 l'usage des codons de gènes de Streptomyces déjà séquencés et rassemblés dans un fichier contenant 19673 codons obtenu à partir du serveur informatique BISANCE (Dessen *et al.* 1990).

Cette méthode a permis de caractériser au sein du fragment PstI-XhoI de 2,9 kb, quatre phases ouvertes de lecture fortement probables qui sont représentées dans le tableau suivant (TABLEAU I). Elles sont nommées phases 1 à 4 d'après leur 25 position à partir du site PstI. Pour chacune, on a indiqué leur longueur en bases et leur position au sein du fragment (le site PstI étant situé à la position 1); pour les phases ouvertes de lecture 2 et 3, a été également indiquée la taille en acides aminés du polypeptide codé. Les phases 1, 3 et 4 sont codées par le même brin et la phase 2 par le brin complémentaire (figure 4). Les phases 1 et 4 correspondent respectivement à la région C-terminale de la protéine PapA et N-terminale de la 30 protéine PapM précédemment identifiées et décrites dans le brevet PCT/FR93/00923.

Numéro de la phase et/ou nom du gène	Position	Nombre de nucléotides	Nombre d'acides aminés
1 (PapA)	1-684	684	-
2 (PapC) (inv)	949-1836	888	296
3 (PapB)	1873-2259	387	129
4 (PapM)	2259-2887	629	-

TABLEAU I

5 La comparaison du produit de la phase 2 (TABLEAU I) avec les séquences protéiques contenues dans la banque Genpro fait apparaître une homologie de 27 % avec la région impliquée dans l'activité préphénate déhydrogénase des protéines bifonctionnelles TyrA d'*E. coli* (Hudson et Davidson, 1984) et d'*Erwinia herbicola* (EMBL data library, 1991). Cette région de TyrA catalyse l'aromatisation du 10 préphénate en 4-hydroxyphénylpyruvate dans la biosynthèse de la tyrosine. Une aromatisation similaire à partir du 4-déoxy 4-amino préphénate conduisant au 4-amino phénylpyruvate intervient très vraisemblablement dans la synthèse de la DMPAPA. Cette réaction serait catalysée par le produit de la phase 2, appelé PapC (SEQ ID n°2).

15

La comparaison du produit de la phase 3 (TABLEAU I) avec les séquences protéiques contenues dans la banque Genpro fait apparaître une homologie de 24 à 30 % avec la région impliquée dans l'activité chorismate mutase des protéines bifonctionnelles TyrA et PheA d'*E. coli* (Hudson et Davidson, 1984) et de la 20 protéine TyrA d'*Erwinia herbicola*. Cette région catalyse l'isomérisation du chorismate en préphénate dans la biosynthèse de la tyrosine et de la phénylalanine.

Une isomérisation similaire à partir du 4-déoxy 4-amino chorismate conduisant au 4-déoxy 4-aminopréphénate intervient très vraisemblablement dans la synthèse de la DMPAPA. Cette réaction serait catalysée par le produit de la phase 3, appelé PapB (SEQ ID n°3).

5 Dans le cas de TyrA et PheA les activités chorismate mutase et préphénate déhydratase ou préphénate déhydrogénase sont catalysées par la même protéine. Chez S. pristinaespiralis, les activités enzymatiques chorismate mutase et préphénate déhydrogénase sont catalysées par deux protéines séparées, PapB et PapC respectivement.

10 Les homologies de séquences mises en évidence pour les protéines PapB et PapC, montrent que ces deux protéines sont impliquées dans la biosynthèse du dérivé aromatique DMPAPA, conjointement avec les protéines PapA et PapM. De même que pour papA la disruption des gènes papB et papC doit conduire à la construction de souches de S. pristinaespiralis incapables de produire de la PI mais susceptibles de 15 produire en présence de précurseurs originaux de nouvelles PI modifiées au niveau du résidu DMPAPA.

1-2. Séquencage et analyse de la région en amont du gène papA.

20 Cette région est contenue entre le gène snbA codant pour l'acide 3-hydroxypicolinique-AMP ligase, décrite dans le brevet PCT/FR93/00923 et le gène papA.

25 Les clonages ont été réalisés comme décrit dans l'exemple 1-1, à partir du plasmide pVRC900 et du cosmide pIBV2 décrits dans le brevet PCT/FR93/00923. Les fragments XbaI-XbaI de 1,3 kb, XbaI-XbaI de 0,2 kb, XbaI-XbaI de 3,3 kb, HindIII-PstI de 1,1 kb et PstI-PstI de 2,2 kb ont été sous-clonés dans les vecteurs M13mp18 et M13mp19. Ces différents clonages ont permis de traverser tous les sites de clonage. Les différents inserts ont été séquencés comme décrit en 1-1, en utilisant 30 comme amorce de synthèse le primer universel ou des oligonucléotides synthétiques, complémentaires d'une séquence de 20 nucléotides de l'insert à séquencer.

Le recouvrement entre ces différents inserts a permis d'établir la séquence nucléotidique totale présente entre les gènes snbA et papA (SEQ ID n° 4).

A partir de cette séquence nucléotidique, il est possible de déterminer les phases 35 ouvertes de lecture et d'identifier des gènes impliqués dans la biosynthèse des

précurseurs de la PI de *S. pristinaespiralis* ainsi que les polypeptides codés par ces gènes.

Nous avons recherché la présence de phases ouvertes de lecture au sein du fragment XhoI-PstI de 4,5 kb contenant la séquence nucléotidique entre les gènes snbA et papA, comme décrit dans l'exemple 1.1. Cette méthode a permis de caractériser au sein du fragment XhoI-PstI de 4,5 kb, quatre phases ouvertes de lecture fortement probables qui sont représentées dans le tableau suivant (TABLEAU II). Elles sont nommées phases 1 à 4 d'après leur position à partir du site XhoI. Pour chacune, on a indiqué leur longueur en bases et leur position au sein du fragment (le site XhoI étant situé à la position 1); pour les phases ouvertes de lecture 2 et 3, on a également indiqué la taille en acides aminés du polypeptide codé. Les phases 2, 3 et 4 sont codées par le même brin et la phase 1 par le brin complémentaire (figure 5). Les phases 1 et 4 correspondent respectivement aux régions N-terminales des protéines SnbA et PapA précédemment identifiées et décrites dans le brevet PCT/FR93/00923.

15

Numéro de la phase et/ou nom du gène	Position	nombre de nucléotides	nombre d'acides aminés
1 (SnbA)(inv)	1-329	329	-
2 (PipA)	607-1671	1065	355
3 (SnbF)	1800-2993	1194	398
4 (PapA)	3018-4496	1479	-

TABLEAU II

20 La comparaison du produit de la phase 2 (TABLEAU II) avec les séquences protéiques contenues dans la banque Genpro fait apparaître une homologie de 30 %

avec l'ornithine cyclodéaminase d' *Agrobacterium tumefaciens* (Schindler et al., 1989). Cette enzyme intervient dans la dernière étape du catabolisme de l'octopine; elle convertit la L-ornithine en L-proline par cyclo-déamination. Des auteurs ont montré par incorporation de lysine marquée, que l'acide 4-oxopipécolique et l' acide 5 3-hydroxypicolinique, retrouvés aussi bien dans la PI_A que dans la virginiamycine S1, dérivaient de la lysine (Molinero et al., 1989; Reed et al., 1989). Une réaction de cyclodéamination de la lysine similaire à celle décrite pour l' ornithine conduirait à la formation d' acide pipécolique. En tenant compte de cette hypothèse le produit de la phase 2 a été appelé PipA (SEQ ID n° 5). Les résultats de mutation dans le gène 10 pipA, présentés en 2-1, montrent l'implication du gène pipA dans la seule synthèse de l' acide pipécolique car cette mutation n' affecte pas la biosynthèse de l'acide 3-hydroxypicolinique, qui dérive aussi de la lysine et dont l'acide pipécolique aurait pu être un précurseur.

La comparaison du produit de la phase 3 (TABLEAU II) avec les séquences 15 protéiques contenues dans la banque Genpro fait apparaître une homologie de 30 à 40 % avec plusieurs hydroxylases de type cytochrome P450 impliquées dans la biosynthèse de métabolites secondaires (Omer et al., 1990. Trower et al., 1992). Plusieurs hydroxylations sont envisageables dans la biosynthèse des précurseurs de la pristinamycine I, notamment au niveau de la biosynthèse du 3-HPA (hydroxylation 20 en 3 de l'acide picolinique) et de l'acide 4-oxopipécolique (hydroxylation en 4 de l'acide pipécolique). Les résultats de mutation dans le gène pipA, présentés en 2-1-3, montrent l'implication du produit de la phase 3 dans l' hydroxylation du résidu acide pipécolique de la PI_E. Le gène correspondant a donc été appelé snbF et la protéine correspondante SnbF (SEQ ID n°6).

25

1-3. Séquencage de la région en aval du gène snbA.

Cette région est comprise entre le gène snbA codant pour l'acide 3-hydroxypicolinique-adénylate-ligase et le gène snbR, codant pour une protéine membranaire probablement responsable du transport et de la résistance à la PI, toutes 30 deux décrites dans le brevet PCT/FR93/00923. Les séquences ont été réalisées à partir d'un fragment isolé du cosmide pIBV2, comme décrit dans l'exemple 1-1.

Le fragment HindIII-BglII de 1,6 kb a été sous-cloné dans les vecteurs M13mp18 et M13mp19, à partir du cosmide pIBV2. L' insert a été séquencé comme 35 décrit en 1-1, en utilisant comme amorce de synthèse le primer universel ou des

oligonucléotides synthétiques, complémentaires d'une séquence de 20 nucléotides de l'insert à séquencer. A partir de la séquence nucléotidique ainsi obtenue (SEQ ID n°7), il est possible de déterminer les phases ouvertes de lecture et d'identifier des gènes impliqués dans la biosynthèse des précurseurs de la PI de *S. pristinaespiralis*

5 ainsi que les polypeptides codés par ces gènes. Nous avons recherché la présence de phases ouvertes de lecture au sein du fragment HindIII- BglII de 1,6 kb correspondant à la fin du gène snbA et à sa région aval, comme décrit dans l'exemple 1-1. Une phase ouverte complète codée par le même brin que le gène snbA (figure 6), a été mise en évidence. Par rapport à la position 1 correspondant au site HindIII, cette

10 phase démarre au nucléotide 249, 30 nucléotides après la fin du gène snbA, et se termine au nucléotide 1481. Sa taille est de 1233 nucléotides correspondant à une protéine de 411 acides aminés.

La comparaison du produit de cette phase ouverte avec les séquences protéiques contenues dans la banque Genpro fait apparaître une homologie de 30 à 40 % avec un groupe de protéines probablement impliquées (Thorson et al., 1993) dans la transamination d'intermédiaires de biosynthèse de différents antibiotiques (DnrJ, EryC1, TylB, StrS, PrgL). La synthèse du précurseur 3-HPA qui semble dériver de la lysine par une autre voie que la cyclodéamination (voir exemples 1-2 et 2-1), pourrait nécessiter une étape de transamination susceptible d'être catalysée par le produit de cette phase 3, appelé HpaA (SEQ ID n°8). Les résultats de mutation dans ce gène, présentés en 2-2, montrent sans équivoque l'implication de ce gène dans la synthèse du précurseur 3-HPA et confirment notre hypothèse.

Les gènes papB, papC, pipA, snbF et hpaA décrits dans la présente invention

25 sont regroupés avec les gènes snbA, papA, et papM sur une région chromosomique de environ 10 kb (figure 7). Ceci confirme la présence d'un cluster de gènes impliqués dans la biosynthèse de la PI et de ses précurseurs. L'étude des régions en amont et en aval de ce cluster devrait permettre d'identifier les autres gènes de biosynthèse des précurseurs de la PI, notamment de la L-phénylglycine et de l'acide

30 L-2-aminobutyrique.

EXEMPLE 2: Construction de souches recombinées par disruption des gènes identifiés.

Cet exemple illustre comment il est possible de mettre en évidence l'implication des gènes décrits dans l'exemple 1, dans la biosynthèse des précurseurs des pristinamycines, ainsi que de construire des souches de *S. pristinaespiralis* capables de produire de nouvelles pristinamycines. Ces souches sont obtenues en disruptant les 5 gènes impliqués dans la biosynthèse du résidu que l'on veut substituer et les nouvelles pristinamycines sont produites en complémentant ces mutants par des précurseurs originaux.

La souche SP92::pVRC508 utilisée dans la présente invention pour produire de nouveaux dérivés de PI en remplaçant le précurseur DMPAPA par d'autres 10 molécules, est décrite dans le brevet PCT/FR93/0923. Elle résulte de la disruption par simple crossing-over du gène papA impliqué dans la biosynthèse du précurseur de la DMPAPA et supposé intervenir dans une étape précoce concernant la transamination du chorismate. Cette disruption a un caractère polaire puisque, dans ce mutant, l'expression du gène papM (PCT/FR93/0923), situé 1,5 kb en aval du gène papA et 15 impliqué dans la double méthylation de la 4-amino-L-phénylalanine en DMPAPA, est

très réduite. En effet le dosage de l'activité de l'enzyme de méthylation SAM-dépendante de la 4-amino-L-phénylalanine (PAPA) en DMPAPA indique pour le mutant SP92::pVRC508 une activité inférieure à 5% de l'activité de la souche 20 sauvage.

Dans la présente invention cette souche SP92::pVRC508 permet dans des conditions de fermentation et de complémentation adéquates de produire de nouvelles pristinamycines, modifiées au niveau du résidu DMPAPA, comme il sera présenté dans l'exemple 3. Des mutants de même phénotype peuvent être obtenus par 25 disruption des gènes papB ou papC décrits dans la présente invention.

D'une manière similaire, un autre type de souche de S. pristinaespiralis, disruptée dans le gène papA et possédant le même phénotype que la souche SP92::pVRC508, a été obtenue par disruption par double crossing over du 30 gène papA. Cette construction a été réalisée à partir d'un fragment SphI-HindIII de 4,6kb, isolé du cosmid pIBV2 et contenant la région 3' du gène papA, les gènes snbF et papA en entier ainsi que la partie 3' du gène papC. Ce fragment a été cloné dans le vecteur suicide pDH5, capable de se répliquer seulement chez *E. coli*, mais portant un marqueur de résistance s'exprimant chez *Streptomyces* (le gène de résistance au thiostrepton ou au nohiheptide, tsr). Ce vecteur pDH5 a été développé par Wohleben 35

et al. (1991 Nucleic Acid. Res. 19, 727-731). Une délétion BclI-BclI de 1,1 kb a ensuite été réalisée dans le gène papA et un fragment HindIII-HindIII de 2,2 kb portant le gène amR (résistance à la génétidine et à l'apramycine) a été introduit après remplissage des extrémités cohésives. Le vecteur recombinant a été appelé pVRC414 et est présenté en figure 12. Après transformation de la souche productrice de pristinamycines par le plasmide pVRC414 des transformants résistants à la génétidine et sensibles au thiostrepton ont été isolés et analysés. Ces clones résultent d'une double recombinaison homologue entre les régions d'ADN de *S. pristinaespiralis* du plasmide pVRC414 et la région chromosomique de *S. pristinaespiralis* correspondante telle que décrite en figure 13. Un de ces clones a été appelé SP212. Son phénotype est identique à celui de la souche SP92::pVRC508 en ce qui concerne la non production de PI et sa capacité à produire de nouveaux antibiotiques en présence de précurseurs originaux. Avantageusement, ce type de souche, obtenue par double crossing over, présente une meilleure stabilité comparativement aux souches obtenues par simple crossing-over.

2-1. Construction d'un mutant de *S.pristinaespiralis* SP92 disrupté dans le gène pipA.

Cet exemple illustre comment il est possible par disruption du gène pipA de construire une souche de *S.pristinaespiralis* SP92 qui ne produit plus de PI dans les conditions standards de fermentation et qui est capable de produire de nouvelles pristinamycines, modifiées au niveau du résidu acide 4-oxopipécolique de la PIA, lorsque des précurseurs originaux sont ajoutés à la fermentation.

25 Sa construction a été réalisée à l'aide d'un vecteur suicide se répliquant chez *E.coli* seulement, le vecteur pUC1318. Ce vecteur ne porte pas de marqueur de résistance s'exprimant chez Streptomyces. Sa présence dans le génome de Streptomyces ne peut être détectée que par hybridation sur colonies.

30 2-1-1. Construction du plasmide pVRC420:

Cet exemple illustre comment il est possible de construire un plasmide ne se répliquant pas chez *S.pristinaespiralis* SP92, qui peut être utilisé pour disrupter par 35 double recombinaison homologue le gène pipA.

Le plasmide pVRC420 a été construit pour réaliser le mutant chromosomique SP92 disrupté dans le gène pipA à partir du cosmid pIBV2 décrit dans le brevet PCT/FR93/0923. Le cosmid pIBV2 a été coupé par l'enzyme de restriction PstI et après séparation des fragments ainsi générés par électrophorèse sur gel d'agarose à 0,8 %, un fragment PstI-PstI de 2,8 kb, contenant le début des gènes snbA et snbF et la totalité du gène pipA a été isolé et purifié par Geneclean (Bio101, La Jolla, Californie). 50 ng du vecteur pUC1318 linéarisés par une digestion PstI, ont été ligués avec 200 ng du fragment de 2,8 kb, comme décrit dans l'exemple 1. Un clone portant le fragment souhaité a été isolé après transformation de la souche TG1 et sélection sur milieu LB + ampicilline 150 µg/ml + X-gal + IPTG. Le plasmide recombinant a été nommé pVRC415 (figure 8). Une cassette contenant le gène am^R, codant pour la résistance à l'apramycine ou à la génétidine (Kuhstoss et al., 1991) a été alors introduite au site unique HindIII du plasmide pVRC415, ce site étant situé 530 pb en aval du démarrage du gène pipA. Cette construction a été réalisée comme suit. Un fragment d'ADN de 2,5 kb contenant le gène am^R, le promoteur PermE (Bibb et al., 1985) ainsi que les 158 premiers acides aminés du gène de résistance à l'érythromycine, ermE a été isolé par une double digestion Sall-BglII à partir d'un plasmide dérivé des plasmides pIJ4026 (plasmide porteur du gène ermE sous contrôle du promoteur PermE) et pH_P45Ωam^R. Après remplissage des extrémités cohésives 5' sortantes Sall et BglII par l'enzyme Klenow selon le protocole décrit par Maniatis et al. 1989, le fragment contenant le gène am^R a été cloné au site HindIII du plasmide pVRC415, dont les extrémités cohésives 5' sortantes avaient été également remplies par l' enzyme Klenow, comme décrit précédemment. Le plasmide recombinant ainsi obtenu a été appelé pVRC420. Sa carte de restriction est présentée figure 9.

2-1-2. Isolement du mutant SP92pipA::Ωam^R, disrupté dans le gène pipA par recombinaison homologue.

30

Cet exemple illustre comment le mutant de S.pristinaespiralis SP92 disrupté dans le gène pipA a été construit.

Ce mutant a été isolé par transformation de la souche SP92 avec le plasmide suicide pVRC420.

La préparation des protoplastes, leur transformation ainsi que l'extraction d'ADN total des souches recombinées ont été réalisées comme décrit par Hopwood et al. (1985).

La souche SP92 a été cultivée en milieu YEME (Hopwood et al., 1985), 34% de sucre, 5 mM MgCl₂, glycine 0,25% pendant 40 heures à 30°C. Le mycélium a été protoplastisé en présence de lysozyme et 5 X 1 µg de pVRC420 ont été utilisés pour la transformation (par la méthode utilisant le PEG) des protoplastes. Après une nuit de régénération des protoplastes sur milieu R2YE (D. Hopwood et al. 1985), les recombinants ont été sélectionnés par également de 3 ml de milieu SNA (D. Hopwood et al. 1985) contenant 1500 µg/ml de génétidine.

Sur les 5 transformations réalisées 100 clones résistants à la génétidine ont été isolés. Ces recombinants résultent de l'intégration par simple ou double recombinaison homologue entre le gène pipA porté par le chromosome de la souche SP92 et les parties du gène pipA contenues dans le fragment de 5,3 kb porté par le plasmide suicide pVRC420. Pour sélectionner les recombinants obtenus par double crossing-over (c'est à dire ne contenant pas dans leur génome la partie pUC1318 du plasmide pVRC420), des hybridations sur colonies de 90 clones ont été réalisées avec comme sonde le pUC19 marqué au [α -³²P]dCTP, comme décrit dans Maniatis et al. (1989). 10 clones résistants à la génétidine mais n'hybridant pas le vecteur pUC19 ont été sélectionnés. Les spores des recombinants ont été isolées par également et croissance sur milieu HT7 + 10 µg/ml de génétidine, et réétagées sur le même milieu pour obtenir des colonies isolées. Afin de vérifier la position de l'intégration du plasmide pVRC420, différents Southern de l'ADN total de plusieurs clones recombinants, purifiés comme décrit par Hopwood et al. 1985, ont été réalisés et hybridés avec le fragment PstI-PstI de 2,8 kb utilisé comme sonde après marquage au [α -³²P]dCTP. Les résultats confirment que ces recombinants ont été obtenus par double crossing-over entre le vecteur pVRC420 et le chromosome de la souche SP92, aboutissant au remplacement du fragment PstI-PstI de 2,8 kb, contenant le gène pipA par un fragment PstI-PstI de 5,3 kb contenant le gène pipA disrupté par l'introduction du gène amR. Un de ces mutants a été nommé SP92pipA::ΩamR.

2-1-3. Production de pristinamycines par le mutant SP92pipA::ΩamR.

Cet exemple illustre comment il est déterminé que le mutant de *S.pristinaespiralis* SP92 disrupté dans le gène *pipA* par l'intégration du plasmide pVR420 d'une part ne produit plus de PI dans les conditions standards de fermentation et d'autre part permet la forte production d'une forme minoritaire des 5 composants B des streptogramines dans lesquels l'acide 4-oxopipécolique est remplacé par l'acide pipécolique.

Le mutant SP92::Qam^R, ainsi que la souche SP92, en tant que souche témoin, ont été cultivés en milieu de production liquide. La fermentation a été 10 réalisée comme suit : 0,5 ml d'une suspension de spores de la souche précitée sont ajoutés en conditions stériles à 40 ml de milieu inoculum dans un erlen chicané de 300 ml. Le milieu inoculum est constitué par 10 g/l de Corn Steep, 15 g/l de saccharose, 10 g/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 g/l de K_2HPO_4 , 3 g/l de NaCl, 0,2 g/l de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ et 1,25 g/l de CaCO_3 . Le pH est ajusté à 6,9 par de la soude avant 15 l'introduction du carbonate de calcium. Les erlens sont agités pendant 44 h à 27°C sur un agitateur rotatif à la vitesse de 325 rpm. 2,5 ml de la culture précédente âgée de 44 h sont ajoutés stérilement à 30 ml de milieu de production dans un erlen de 300 ml. Le milieu de production est constitué par 25 g/l de farine de soja, 7,5 g/l d'amidon, 22,5 g/l de glucose, 3,5 g/l de levure fourragère, 0,5 g/l de sulfate de zinc et 6 g/l de 20 carbonate de calcium. Le pH est ajusté à 6,0 par de l'acide chlorhydrique avant l'introduction du carbonate de calcium. Les erlens sont agités pendant 24, 28 et 32 heures à 27°C. A chaque temps, 10 g de moût sont pesés dans un erlen lisse, auxquels sont ajoutés 20 ml de phase mobile composée de 34 % d'acetonitrile et 66 % 25 d'une solution de 0,1 M de KH_2PO_4 (ajusté à pH 2,9 par H_3PO_4 concentré) permettant l'extraction des pristinamycines. Après agitation, le tout est centrifugé et les pristinamycines contenues dans le surnageant sont dosées par CLHP en injectant 150 µl du surnageant de centrifugation sur une colonne Nucléosil 5-C8 de 4,6 x 150 mm élue par un mélange de 40 % d'acetonitrile et de 60 % de tampon phosphate 0,1 M pH 2,9. Les pristinamycines I sont détectées grâce à leur absorbance UV à 206 nm.

30

Les résultats ont montré que dans les conditions de fermentation réalisées, le mutant SP92::Qam^R n'a pas produit de PI, ceci à 24, 28 et 32 hrs de fermentation, alors que le témoin SP92 a produit pour les 3 temps testés, une quantité standard de PI. Pour les deux souches, la quantité de PII produite est restée la même. 35 Le mutant SP92::Qam^R est bien bloqué dans une étape de biosynthèse de la PI.

Des tests complémentaires de fermentation ont été réalisés en ajoutant au bout de 16 heures à la culture en milieu de production, les différents précurseurs de la PI, séparément ou ensemble. Les résultats de ces complémentations ont permis de montrer que lorsqu' on ajoute au milieu de fermentation 100 mg/l d' acide pipécolique et 100 mg/l de DMPAPA, simultanément, le mutant produit un dérivé normalement mineur de la PI, la PI_E (dont la quantité produite est inférieure à 5 % chez SP92), à un niveau équivalent à la production de PI_A par la souche témoin. Cette production n' a pas lieu si l' acide pipécolique et le DMPAPA sont ajoutés séparément. La PI_E diffère de la PI_A (composant majeur de la PI) par l'absence de la fonction cétone en 4 sur l' acide pipécolique. Le fait que la complémentation du mutant SP92~~pipA::Ωam~~^R ne puisse être réalisée qu' en ajoutant simultanément l'acide pipécolique et la DMPAPA, indique que les gènes papA et probablement papB et papM ont été disruptés par effet polaire de la construction. En effet, tous ces gènes sont situés en aval de pipA, et sont probablement cotranscrits avec pipA. La disruption de ce dernier entraîne donc la disruption des gènes pap et par conséquence l'absence de synthèse de la DMPAPA. Le fait que la complémentation du mutant SP92~~pipA::Ωam~~^R par l' acide pipécolique, entraîne la production de PI_E et non de PI_A, conduit à deux conclusions : la première est que la construction du cycle de la PI se fait par incorporation de l'acide pipécolique et non de l' acide 4-oxopipécolique, et qu' une hydroxylation générant la fonction cétone en 4 a alors lieu ultérieurement. La deuxième est que cette hydroxylation est probablement réalisée par l'enzyme SnbF, dont le gène de structure se situe directement en aval du gène pipA. En effet, la polarité évidente de la disruption du gène pipA, sur les gènes pap, implique probablement un effet polaire sur le gène snbF, situé entre pipA et les gènes pap, qui se traduit par l'inhibition de la fonction d'hydroxylation du résidu acide pipécolique de la PI_E en acide 4-hydroxypipécolique retrouvé dans les PI_F et PI_G (figure 2) puis oxydé en acide 4-oxopipécolique dans la PI_A.

La réalisation d'un tel mutant a permis de construire une souche de S. pristinaespiralis incapable de produire de la PI sauf en présence des précurseurs de PI, DMPAPA et acide pipécolique, à partir desquels elle est capable de produire en quantité équivalente à la souche de départ un dérivé de PI normalement minoritaire dans le mélange de pristinamycine. De même en présence de précurseurs originaux ou d'un mélange de précurseurs originaux et des précurseurs normalement présents dans la PI, cette souche pourra produire de nouvelles pristinamycines, modifiées dans l'un ou l'autre ou dans les deux résidus DMPAPA et acide 4-oxopipécolique.

2-2. Construction d'un mutant de S.pristinaespiralis SP92 disrupté dans le gène hpaA.

5

Cet exemple illustre comment il est possible par disruption du gène hpaA de construire une souche de S.pristinaespiralis SP92 qui ne produit plus de PI dans les conditions standards de fermentation et qui est capable de produire de nouvelles pristinamycines, modifiées au niveau du précurseur 3-HPA, lorsque des précurseurs 10 originaux sont ajoutés à la fermentation.

Sa construction a été réalisée à l'aide d'un plasmide ne se répliquant pas chez S.pristinaespiralis SP92, qui peut être utilisé pour disrupter par double recombinaison homologue le gène hpaA.

15

2-2-1. construction du plasmide suicide pVRC421

La construction du plasmide pVRC421 a été réalisée à l'aide d'un vecteur 20 suicide, capable de se répliquer chez E.coli seulement, mais portant un marqueur de résistance s'exprimant chez Streptomyces, le gène de résistance au thiostrepton ou au nosiheptide, tsr. Ce vecteur, pDH5, a été développé par Hillemann et al. (1991).

Le plasmide pVRC421 a été construit pour réaliser le mutant chromosomique 25 SP92 disrupté dans le gène hpaA, à partir du cosmide pIBV2 décrit dans le brevet PCT/FR93/0923. Le pIBV2 a été digéré par l'enzyme de restriction SphI et après séparation des fragments ainsi générés par électrophorèse sur gel d'agarose à 0,6 %, un fragment SphI-SphI de 4,8 kb, contenant la totalité du gène hpaA et la quasi totalité du gène snbA a été isolé et purifié par Geneclean comme décrit plus haut. 50 30 ng du vecteur pDH5 linéarisés par une digestion SphI, ont été ligués avec 200 ng du fragment de 4,8 kb, comme décrit ultérieurement. Un clone portant le fragment souhaité a été isolé après transformation de la souche TG1 et sélection sur milieu LB + ampicilline 150 µg/ml + IPTG + X-gal. Le plasmide recombinant a été nommé pVRC411 (figure 10). Une cassette contenant le gène amR codant pour la résistance à l'apramycine ou à la généticine a été alors introduite au site unique PflmI du plasmide 35

pVRC411, ce site étant situé 610 pb en aval du démarrage du gène hpaA. Cette construction a été réalisée comme suit. Un fragment d'ADN de 2,2 kb contenant le gène am^R a été isolé après digestion du plasmide pHP45Ωam^R contenant le gène am^R, par HindIII. Après remplissage des extrémités cohésives 5' sortantes HindIII par l'enzyme Klenow selon le protocole décrit par Maniatis et al. 1989, le fragment contenant le gène am^R a été cloné au site PflmI du plasmide pVRC411, dont les extrémités cohésives 3' sortantes avaient été rendues franches par l'enzyme T4 polymérase, comme décrit dans Maniatis et al. 1989. Le plasmide recombinant ainsi obtenu a été appelé pVRC421. Sa carte de restriction est présentée figure 11.

10

2-2-2. Isolement du mutant SP92hpaA::Ωam^R, disrupté dans le gène hpaA par recombinaison homologue.

15

Cet exemple illustre comment le mutant de S.pristinaespiralis SP92, disrupté dans le gène hpaA a été construit.

Ce mutant a été isolé par transformation de la souche SP92 avec le plasmide suicide pVRC421.

La préparation des protoplastes et leur transformation ont été réalisées comme décrit précédemment.

20

La souche SP92 a été cultivée en milieu YEME, 34% de sucre, 5 mM MgCl₂, glycine 0,25% pendant 40 heures à 30°C. Le mycélium a été protoplastisé en présence de lysozyme et 5 X 1 µg de pVRC421 ont été utilisés pour la transformation (par la méthode utilisant le PEG) des protoplastes. Après une nuit de régénération des protoplastes sur milieu R2YE, les recombinants ont été sélectionnés par étalement de 3 ml de milieu SNA contenant 1500 µg/ml de généticine.

25

Sur les 5 transformations réalisées 600 clones résistants à la généticine ont été isolés. Ces recombinants résultent de l'intégration par simple ou double recombinaison homologue entre le gène hpaA porté par le chromosome de la souche SP92 et le fragment de 6 kb du plasmide suicide pVRC421. Pour sélectionner les recombinants obtenus par double crossing-over (c'est à dire les clones ne contenant plus dans leur génome la partie pDH5 du plasmide pVRC421), les clones ont été repiqués sur milieu HT7 contenant 400 µg/ml de thiostrepton. 6 clones résistants à la généticine mais sensibles au thiostrepton ont été sélectionnés. Les spores des recombinants ont été isolées par étalement et croissance sur milieu HT7 + 10 µg/ml de généticine, et réétalées sur le même milieu pour obtenir des colonies isolées. Afin

30

35

de vérifier la position de l'intégration du plasmide pVRC421, différents Southern de l'ADN total des 6 clones recombinants, purifiés comme décrit par Hopwood et al. 1985, ont été réalisés et hybridés avec le fragment SphI-SphI de 4,8 kb utilisé comme sonde après marquage au [α -³²P]dCTP. Les résultats confirment que ces 5 recombinants ont été obtenus par double crossing-over entre le vecteur pVRC421 et le chromosome de la souche SP92, aboutissant au remplacement du fragment SphI-SphI de 4,8 kb, contenant le gène hpaA par un fragment SphI-SphI de 6 kb contenant le gène hpaA disrupté par le gène am^R. Un de ces mutants a été nommé SP92hpaA::Ωam^R.

10

2-2-3. Production de pristinamycines par le mutant SP92hpaA::Ωam^R.

Cet exemple illustre comment il est déterminé que le mutant de 15 S.pristinaespiralis SP92 disrupté dans le gène hpaA par l'intégration du plasmide pVR421, ne produit plus de PI dans les conditions standards de fermentation.

Le mutant SP92hpaA::Ωam^R, ainsi que la souche SP92, en tant que souche 20 témoin, ont été cultivés en milieu de production liquide. La fermentation a été réalisée comme décrit à l'exemple 2-1-3 puis les pristinamycines ont été extraites et dosées comme décrit précédemment. Les résultats ont montré que dans les conditions de fermentation réalisées, le mutant SP92hpaA::Ωam^R n'a pas produit de PI, ceci à 24, 28 et 32 hrs de fermentation, alors que le témoin a produit pour les 3 temps testés, une quantité standard de PI. Pour les deux souches, la quantité de PII produite est 25 restée la même. Le mutant SP92hpaA::Ωam^R est bien bloqué dans une étape de biosynthèse de la PI. Des tests complémentaires de fermentation ont été réalisés en ajoutant au bout de 16 heures à la culture en milieu de production les différents précurseurs de la PI, séparément ou ensemble. Quand on ajoute au milieu de fermentation 100 mg/l d' acide 3-hydroxypicolinique, le mutant produit alors de la 30 PI_A à un niveau équivalent à la production de PI par la souche témoin. Le fait que la complémentation du mutant SP92hpaA::Ωam^R ne puisse être réalisée qu'en ajoutant de l' acide 3-hydroxypicolinique, montre que le gène hpaA est impliqué dans la synthèse de ce précurseur.

La construction de ce mutant a permis de réaliser une souche de S. 35 pristinaespiralis mutée pour sa production de PI, mais qui en présence du précurseur

3-HPA est capable de produire en quantité équivalente à la souche de départ de la PI. De même que dans les exemples précédents, il est envisageable à partir d'un tel mutant et en présence de précurseurs originaux de produire de nouvelles pristinamycines modifiées au niveau du résidu acide 3-hydroxypicolinique.

5

EXEMPLE 3: Production de composés de formule générale I par le
10 mutant SP92::pVRC508.

Cet exemple illustre comment le mutant de S. pristinaespiralis SP92 disrupté dans le gène papA par l'intégration du plasmide pVRC508 est capable de synthétiser de nouvelles streptogramines en présence de précurseurs ajoutés dans le milieu de production. Ces précurseurs peuvent être des dérivés d'acides aminés et plus particulièrement de phénylalanine mais aussi d'acides α -cétocarboxyliques et plus particulièrement d'acide phénylpyruvique.

Le mutant SP92::pVRC508 a été cultivé en milieu de production liquide. La fermentation a été réalisée comme suit : 0,5 ml d'une suspension de spores de la souche précitée est ajouté en conditions stériles à 40 ml de milieu inoculum dans un erlen chicané de 300 ml. Le milieu inoculum est constitué par 10 g/l de Corn Steep, 15 g/l de saccharose, 10 g/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 g/l de K_2HPO_4 , 3 g/l de NaCl, 0,2 g/l de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ et 1,25 g/l de CaCO_3 . Le pH est ajusté à 6,9 par de la soude avant l'introduction du carbonate de calcium. Les erlens sont agités pendant 44 h à 27°C sur un agitateur rotatif à la vitesse de 325 rpm. 2,5 ml de la culture précédente âgée de 44 h sont ajoutés stérilement à 30 ml de milieu de production dans un erlen de 300 ml. Le milieu de production est constitué par 25 g/l de farine de soja, 7,5 g/l d'amidon, 22,5 g/l de glucose, 3,5 g/l de levure fourragère, 0,5 g/l de sulfate de zinc et 6 g/l de carbonate de calcium. Le pH est ajusté à 6,0 par de l'acide chlorhydrique avant l'introduction du carbonate de calcium. Les erlens sont agités à 27°C sur un agitateur rotatif à la vitesse de 325 rpm. Au bout de 16h, 1 ml d'une solution d'un des précurseurs listés dans le tableau 3 (généralement 5 ou 10 g/l) est ajouté à la culture. Celle-ci est arrêtée 8 ou 24 h plus tard. Aussitôt le moût est volumé et on lui ajoute 2 volumes de phase mobile composée de 34 % d'acetonitrile et 66 % d'une solution de 0,1 M de KH_2PO_4 (ajusté à pH 2,9 par H_3PO_4 concentré) permettant l'extraction des

pristinamycines. Après agitation, le tout est centrifugé et les pristinamycines contenues dans le surnageant sont extraites et purifiées comme décrit dans l'exemple 4. Elles sont également dosées par CLHP en injectant 150 µl du surnageant de centrifugation sur une colonne Nucléosil 5-C8 de 4,6 x 150 mm éluée par un mélange de 40 % d'acétonitrile et de 60 % de tampon phosphate 0,1 M pH 2,9. Les nouvelles pristinamycines I sont détectées grâce à leur absorbance UV à 206 nm et éventuellement grâce à leur émission de fluorescence (filtre 370 nm, excitation à 306 nm).

10

PRECURSEUR	ORIGINE
Phénylalanine	Janssen
4-Diméthylaminophénylalanine	Exemple 33
4-Méthylaminophénylalanine	Exemple 34-1
4-Aminophénylalanine	Janssen 22.794.96
4-Diéthylaminophénylalanine	Exemple 33
4-Ethylaminophénylalanine	Exemple 33
4-Méthylthiophénylalanine	Exemple 33
4-Méthylphénylalanine	J.P.S101-312-4/ Exemple 33
4-Méthoxyphénylalanine	Janssen 16.975.97
4-Trifluorométhoxyphénylalanine	Exemple 34-8
4-Méthoxycarbonylphénylalanine	Exemple 33
4-Chlorophénylalanine	Janssen 15.728.14
4-Bromophénylalanine	Janssen 22.779.81
4-Iodophénylalanine	Bachem F 1675
4-Trifluorométhylphénylalanine	P.C.R. Inc. 12 445-3
4-tert-Butylphénylalanine	Exemple 35-1
4-Isopropylphénylalanine	Exemple 36-1
3-Méthylaminophénylalanine	Exemple 35-3
3-Méthoxyphénylalanine	J.P.S. 101-313-2
3-Méthylthiophénylalanine	Exemple 34-11

3-Fluoro 4-Méthylphénylalanine	Exemple 34-5
Acide 4-tert-Butylphénylpyruvique	Exemple 33
Acide 4-Méthylaminophénylpyruvique	Exemple 34-4
2-Naphtylphénylalanine	Bachem F 1865
4-Fluorophénylalanine	Bachem F 1535
PRECURSEUR	ORIGINE
3-Fluorophénylalanine	Bachem F 2135
3-Ethoxyphénylalanine	Exemple 37-1
2,4-Diméthylphénylalanine	Exemple 33
3,4-Diméthylphénylalanine	Exemple 33
3-Méthylphénylalanine	Exemple 33
4-Phénylphénylalanine	Exemple 33
4-Butylphénylalanine	Exemple 36-3
2-Thiényl-3-Alanine	Aldrich 28.728.8
3-Trifluorométhylphénylalanine	Exemple 33
3-Hydroxyphénylalanine	Aldrich T 9.039.5
3-Ethylaminophénylalanine	Exemple 35-6
4-Aminométhylphénylalanine	Exemple 33
4-Allylaminophénylalanine	Exemple 38-2
4-Diallylaminophénylalanine	Exemple 38-1
4-Allyl éthylaminophénylalanine	Exemple 39-4
4-Ethyl propylaminophénylalanine	Exemple 39-6
4-Ethyl isopropylaminophénylalanine	Exemple 39-1
4-Ethylméthylcyclopropylaminophénylalanine	Exemple 39-8
4-(1-pyrrolidinyl) phénylalanine	Exemple 40-1
4-O-allyltyrosine	Exemple 33
4-O-Ethyltyrosine	Exemple 33
4-Ethylthiophénylalanine	Exemple 33
4-Ethylthiométhylphénylalanine	Exemple 41-1
4-O-(2-Chloroéthyl) tyrosine	Exemple 42-1
4-Acétyl phénylalanine	Exemple 33

4-Ethyl phénylalanine	Exemple 33
3-Diméthylaminophénylalanine	Exemple 35-10

TABLEAU III

Le tableau suivant (TABLEAU IV) indique les temps de rétention relatifs des nouvelles P I produites en prenant pour référence la PI_A. Les temps de rétention absolus ont été déterminés à 25°C dans le système CLHP décrit ci-dessus; ils varient 5 légèrement d'une injection à l'autre d'une part et en fonction de la température d'autre part.

Précureur	t _R (temps de rétention relatif) des nouvelles P I (Neo P I)		
	Neo P I _A	Neo P I _H	Autres neo P I
4-Méthylaminophénylalanine	0,85		
4-Aminophénylalanine	0,64		
4-Méthylthiophénylalanine	1,93	2,73	1,63
4-Méthylphénylalanine	1,77	2,65	
4-Méthoxyphénylalanine	1,46		
4-Méthoxycarbonylphénylalanine	1,49		
4-Chlorophénylalanine	2,04		
4-Bromophénylalanine	2,16		
4-Iodophénylalanine	2,42		
4-Trifluorométhylphénylalanine	2,56	3,74	
4-tert-Butylphénylalanine	3,34		
4-Isopropylphénylalanine	2,80		4,35
3-Méthylaminophénylalanine	1,15		
3-Méthoxyphénylalanine	1,49	2,04	
3-Fluoro 4-Méthylphénylalanine	2,93		
Acide 4-tert-Butylphényl-pyruvique	3,34		

Acide 4-Méthylaminophénylpyruvique	0,85		
4-Ethylamino phénylalanine	0,94		
4-Diéthylaminophénylalanine	0,61		
4-Allylaminophénylalanine	1,83		
4-Diallylaminophénylalanine	2,64		
4-Allyl éthylaminophénylalanine	2,4		
4-Ethylpropylaminophénylalanine	1,06		
4-Ethylisopropylaminophénylalanine	0,89		
4-Ethylméthylcyclopropylaminophénylalanine	1,1		
4-(1-pyrrolidinyl) phénylalanine	2,0		
4-O-Trifluorométhyltyrosine	2,42		
4-O-allyltyrosine	2,62		
4-O-Ethyltyrosine	2,2		
4-Ethylthiophénylalanine	1,96		
4-Méthylthiométhylphénylalanine	1,98		
4-O-(2-Chloroéthyl) tyrosine	2,45		
4-Acetyl phénylalanine	1,61		
4-Ethyl phénylalanine	1,86	2,40	
3-Diméthylaminophénylalanine	1,49		
3-Méthylthiophénylalanine	1,93		
3-O-Ethyltyrosine	1,78		

TABLEAU IV

La nouvelle P I de t_R 4,35 pour la 4-Isopropylphénylalanine correspond à une neo P I_E décrite dans l'exemple 14.

La nouvelle P I de t_R 1,63 pour la 4-Méthylthiophénylalanine correspond à une 5 γ -hydroxy neo P I_H décrite dans l'exemple 5.

Par ailleurs le mutant SP92::pVRC508 a été fermenté en présence de 4-diméthylamino phénylalanine. Dans ces conditions de complémentation le mutant SP92::pVRC508 produit une quantité de pristinamycines I_A équivalente à celle produite par la souche SP92.

5

EXEMPLE 4: Préparation de la pristinamycine I_B [4 ζ -méthylamino-dés(4 ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A] et de la 4 ζ -amino-dés(4 ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A

10 4.1: Préparation de la pristinamycine I_B [4 ζ -méthylamino-dés(4 ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A]

On réalise à l'échelle de 60 erlenmeyers comme décrit dans l'exemple 3 une culture de la souche SP92::pVRC508 en milieu de production avec ajout à 16h de 1 ml d'une solution à 10 g/l dans l'eau de 4-méthylaminophénylalanine (R,S) synthétisée comme à l'exemple 34-1. Au terme de 40 h de culture, les 1,8 litres de moût issus de 60 erlenmeyers sont extraits par 2 volumes d'un mélange de 66% de tampon phosphate 100 mM pH 2,9 et 34% d'acetonitrile, puis centrifugés. Le surnageant est extrait par 2 fois 0,5 volumes de dichlorométhane. Les phases chlorométhyléniques sont lavées à l'eau puis combinées, séchées sur sulfate de sodium et évaporées. L'extrait sec est repris par 20 ml de dichlorométhane et injecté sur une colonne de silice (30g) montée dans le dichlorométhane et éluée successivement par paliers de 0 à 10 % de méthanol dans le dichlorométhane. Les fractions contenant la pristinamycine I_B sont regroupées et évaporées. Le résidu sec est repris par 6 ml d'un mélange 65% eau et 35% acetonitrile et injecté sur une colonne semi-préparative Nucléosil 7 μ C8 10x250 mm (Macherey Nagel) éluée dans un mélange de 65% de tampon phosphate 100 mM pH 2,9 et 35% d'acetonitrile. Les fractions contenant la pristinamycine I_B sont regroupées et extraites par un volume de dichlorométhane. La phase organique est lavée à l'eau, séchée sur sulfate de sodium puis évaporée. On obtient 52 mg de pristinamycine I_B.

30 Spectre de R.M.N. ¹ H (400 MHz, CDCl₃, δ en ppm, ref. TMS): 0.71 (dd, J= 16 et 6 Hz, 1H, 5 β_2), 0.92 (t, J= 7.5 Hz, 3H: CH₃ 2 γ), de 1.10 à 1.40 (mt, 2H: 3 β_2 et 3 γ_2), 1.34 (d, J= 7.5 Hz, 3H: CH₃ 1 γ), de 1.50 à 1.85 (mt, 3H: 3 γ_1 et CH₂ 2 β), 2.03 (mt, 1H, 3 β_1), 2.22 (mt, 1H, 5 δ_2), 2.33 (d large, J= 16 Hz, 1H: 5 δ_1), 2.40 (d, J= 16 Hz, 1H: 5 β_1), 2.82 (mt, 1H: 5 ϵ_2), 2.81 (s, 3H: 4 NCH₃ en para du phényle), 2.90 (dd,

J= 12 et 4 Hz, 1H: 4 β_2), 3.29 (s, 3H: 4 NCH₃), de 3.20 à 3.45 et 3.60 (2 mts, 1H chacun: CH₂ 3 δ), 3.40 (t, J= 12 Hz, 1H: 4 β_1), 4.57 (dd, J= 7 et 8 Hz, 1H, 3 α), 4.75 (dd large, J= 13 et 7 Hz, 1H: 5 ϵ_1), 4.83 (mt, 1H: 2 α), 4.89 (d large, J= 10 Hz, 1H: 1 α), 5.24 (dd, J= 12 et 4 Hz, 1H: 4 α), 5.32 (d large, J= 6 Hz, 1H: 5 α), 5.89 (d, J= 9 5 Hz, 1H: 6 α), 5.90 (q large, J= 7.5 Hz, 1H: 1 β), 6.53 (d, J= 9 Hz, 1H: NH 2), 6.53 (d, J= 8 Hz, 2H: 4 ϵ), 7.03 (d, J= 8 Hz, 2H: 4 δ), de 7.10 à 7.35 (mt, 5H: H Aromatiques 6), 7.46 (mt, 2H: 1' H₅ et 1' H₄), 7.85 (dd, J = 5.5 et 2 Hz, 1H: 1' H₆), 8.44 (d, J= 10 Hz, 1H: NH 1), 8.76 (d, J= 9 Hz, 1H: NH 6), 11.63 (s, 1H: OH).

4.2: Préparation de la 4ζ -amino-dés(4ζ -diméthylamino) pristinamycine IA

On réalise à l'échelle de 60 erlenmeyers comme décrit dans l'exemple 3 une culture de la souche SP92::pVRC508 en milieu de production avec ajout à 16h de 1 ml d'une solution à 5 g/l dans l'eau de 4-aminophénylalanine (S). Au terme de 40 h de culture, les 1,8 litres de mout issus de 60 erlenmeyers sont extraits par 2 volumes d'un mélange de 66% de tampon phosphate 100 mM pH 2,9 et 34% d'acetonitrile, puis centrifugés. Le surnageant est extrait par 2 fois 0,5 volumes de dichlorométhane. Les phases chlorométhyléniques sont lavées à l'eau puis combinées, séchées sur sulfate de sodium et évaporées. L'extrait sec est repris par 20 ml de dichlorométhane et injecté sur une colonne de silice (30g) montée dans le dichlorométhane et éluée successivement par paliers de 0 à 10 % de méthanol dans le dichlorométhane. Les fractions contenant le nouveau dérivé de pristinamycine IA sont regroupées et évaporées. Le résidu sec est repris par 6 ml d'un mélange 65% eau et 35% acetonitrile et injecté sur une colonne semi-préparative Nucléosil 7 μ C8 10x250 mm (Macherey Nagel) éluée dans un mélange de 65% de tampon phosphate 100 mM pH 2,9 et 35% d'acetonitrile. Les fractions contenant la nouvelle pristinamycine sont regroupées et extraites par un volume de dichlorométhane. La phase organique est lavée à l'eau, séchée sur sulfate de sodium puis évaporée. On obtient 5 mg de 4ζ -amino-dés(4ζ -diméthylamino) pristinamycine IA.

Spectre de R.M.N. 1 H (400 MHz, CDCl₃, δ en ppm, ref. TMS): 0.72 (dd, J= 16 et 5.5 Hz, 1H, 5 β_2), 0.90 (t, J= 7.5 Hz, 3H: CH₃ 2 γ), de 1.10 à 1.40 (mt, 2H: 3 β_2 et 3 γ_2), 1.33 (d, J= 7.5 Hz, 3H: CH₃ 1 γ), de 1.50 à 1.85 (mt, 3H: 3 γ_1 et CH₂ 2 β), 2.02 (mt, 1H, 3 β_1), 2.19 (mt, 1H, 5 δ_2), 2.33 (d large, J= 16 Hz, 1H: 5 δ_1), 2.42 (d, J= 16 Hz, 1H: 5 β_1), 2.81 (dt, J= 13 et 4 Hz, 1H: 5 ϵ_2), 2.90 (dd, J= 12 et 4 Hz, 1H: 4 β_2), 3.24 (s, 3H: NCH₃ 4), de 3.20 à 3.40 et 3.54 (2 mts, 1H chacun: CH₂ 3 δ), 3.30 (t, J= 12 Hz, 1H: 4 β_1), 3.72 (mf, 2H: ArNH₂), 4.54 (dd, J= 7.5 et 7 Hz, 1H, 3 α), 4.73 (dd large, J= 13 et 8 Hz, 1H: 5 ϵ_1), 4.82 (mt, 1H: 2 α), 4.89 (d large, J= 10 Hz, 1H: 1 α), 5.22 (dd, J= 12 et 4 Hz, 1H: 4 α), 5.32 (d large, J= 5.5 Hz, 1H: 5 α), 5.89 (mt, 2H: 6 α et 1 β), 6.51 (d, J= 9.5 Hz, 1H: NH 2), 6.61 (d, J= 8 Hz, 2H: 4 ϵ), 6.98 (d, J= 8 Hz, 2H: 4 δ), de 7.15 à 7.35 (mt, 5H: H Aromatiques 6), 7.45 (dd, J= 8.5 et 1.5 Hz, 1H: 1' H₄), 7.48 (dd, J= 8.5 et 4 Hz, 1H: 1' H₅), 7.82 (dd, J= 4 et 1.5 Hz, 1H: 1' H₆), 8.43 (d, J= 10 Hz, 1H: NH 1), 8.76 (d, J= 9.5 Hz, 1H: NH 6), 11.63 (s, 1H: OH).

EXEMPLE 5 : Préparation de la 4ζ -méthylthio-dés(4ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A, de la 4ζ -méthylthio-dés(4ζ -diméthylamino) pristinamycine I_H et de la 5 γ hydroxy 4ζ -méthylthio-dés(4ζ -diméthylamino) pristinamycine I_H

5

On réalise à l'échelle de 60 erlenmeyers comme décrit dans l'exemple 3 une culture de la souche SP92::pVRC508 en milieu de production avec ajout à 16h de 1 ml d'une solution à 10 g/l dans la soude 0,1N de 4-méthylthiophénylalanine (R,S) synthétisée comme à l'exemple 33. Au terme de 40 h de culture, les 1,8 litres de moût issus de 60 erlenmeyers sont extraits par 2 volumes d'un mélange de 66% de tampon phosphate 100 mM pH 2,9 et 34% d'acétonitrile, puis centrifugés. Le surnageant est extrait par 2 fois 0,5 volumes de dichlorométhane. Les phases chlorométhyléniques sont lavées à l'eau puis combinées, séchées sur sulfate de sodium et évaporées. L'extrait sec est repris par 20 ml de dichlorométhane et injecté sur une colonne de silice (30g) montée dans le dichlorométhane et éluée successivement par paliers de 0 à 10 % de méthanol dans le dichlorométhane. Les fractions contenant le nouveau dérivé de pristinamycine I_A sont regroupées et évaporées. On obtient 65 mg de résidu sec. Celui-ci est repris par 6 ml d'un mélange 60% eau et 40% acétonitrile et injecté en 2 fois sur une colonne semi-préparative Nucléosil 7 μ C8 10x250 mm (Macherey Nagel) éluée dans un mélange de 55% de tampon phosphate 100 mM pH 2,9 et 45% d'acétonitrile. Les fractions contenant la nouvelle pristinamycine sont regroupées et extraites par un volume de dichlorométhane. La phase organique est lavée à l'eau, séchée sur sulfate de sodium puis évaporée. On obtient 45 mg de 4ζ -méthylthio-dés(4ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A.

25

Spectre de R.M.N. ¹ H (400 MHz, CDCl₃, δ en ppm, ref. TMS): 0.68 (dd, J= 16 et 5.5 Hz, 1H, 5 β_2), 0.93 (t, J= 7.5 Hz, 3H: CH₃ 2 γ), 1.13 (mt, 1H: 3 β_2), de 1.25 à 1.40 (mt, 1H: 3 γ_2), 1.33 (d, J= 7.5 Hz, 3H: CH₃ 1 γ), de 1.55 à 1.85 (mt, 3H: 3 γ_1 et CH₂ 2 β), 2.02 (mt, 1H, 3 β_1), 2.18 (mt, 1H, 5 δ_2), 2.38 (d large, J= 16.5 Hz, 1H: 5 δ_1), 2.46 (s, 3H: SCH₃), 2.48 (d, J= 16 Hz, 1H, 5 β_1), 2.85 (dt, J= 13.5 et 4 Hz, 1H: 5 ϵ_2), 3.00 (dd, J= 12 et 5 Hz, 1H: 4 β_2), 3.23 (s, 3H: NCH₃ 4), 3.37 (t, J= 12 Hz, 1H: 4 β_1), 3.37 et 3.58 (2 mts, 1H chacun: CH₂ 3 δ), 4.55 (t, J= 7.5 Hz, 1H, 3 α), 4.77 (dd large, J= 13.5 et 8 Hz, 1H: 5 ϵ_1), 4.86 (mt, 1H: 2 α), 4.89 (dd, J= 10 et 1.5 Hz, 1H: 1 α), 5.30 (d large, J= 5.5 Hz, 1H: 5 α), 5.32 (dd, J= 12 et 5 Hz, 1H: 4 α), 5.90 (d, J= 9.5 Hz, 1H: 6 α), 5.92 (dq, J= 7.5 et 1.5 Hz, 1H: 1 β), 6.55 (d, J= 9.5 Hz, 1H: NH 2), 7.13 (d, J= 8 Hz, 2H: 4 δ), de 7.15 à 7.35 (mt, 5H: H Aromatiques 6), 7.19 (d, J= 8

Hz, 2H: 4e), 7.45 (mt, 2H: 1' H₄ et 1' H₅), 7.76 (t, J = 5 Hz, 1H: 1' H₆), 8.42 (d, J= 10 Hz, 1H: NH 1), 8.76 (d, J= 9.5 Hz, 1H: NH 6), 11.65 (s, 1H: OH).

5 À partir des fractions issues de la colonne de silice décrite ci-dessus, contenant le nouveau dérivé de pristinamycine I_H, 10 mg de 4 ζ -méthylthio-dés(4 ζ -diméthylamino) pristinamycine I_H sont isolés en opérant la chromatographie sur colonne semi-préparative comme décrit ci-dessus mais en portant la proportion d'acétonitrile de la phase éluante à 50%.

10 Spectre de R.M.N. ¹ H (400 MHz, CDCl₃, δ en ppm, ref. TMS): 0.32 (mt, 1H, 5 β_2), 0.93 (t, J= 7.5 Hz, 3H: CH₃ 2 γ), de 1.20 à 1.35 (mt, 2H: 3 β_2 et 3 γ_2), 1.30(d, J= 7.5 Hz, 3H: CH₃ 1 γ), de 1.35 à 2.05 (mt, 9H: 3 γ_1 - 3 β_1 - CH₂ 2 β - CH₂ 5 δ - CH₂ 5 γ et 5 β_1), 2.44 (dt, J= 13.5 et 1.5 Hz, 1H: 5 ϵ_2), 2.49 (s, 3H: SCH₃), 2.99 (dd, J= 12 et 5 Hz, 1H: 4 β_2), 3.09 (dd, J= 12.5 et 12 Hz, 1H: 4 β_1), 3.54 et 3.64 (2 mts, 1H 15 chacun: CH₂ 3 δ), 4.17 (dd, J= 7 et 6 Hz, 1H: 3 α), 4.49 (d large, J= 13.5 Hz: 1H: 5 ϵ_1), de 4.70 à 4.80 (mt, 3H: 2 α - 5 α et 4 α), 4.84 (dd, J=10 et 1.5 Hz, 1H: 1 α), 5.51 (d, J= 7 Hz, 1H: 6 α), 5.73 (mt, 1H: 1 β), 6.65 (d, J= 9.5 Hz, 1H: NH 2), 7.10 (d, J= 8 Hz, 2H: 4 δ), 7.22 (d, J= 8 Hz, 2H: 4e), de 7.20 à 7.40 (mt, 7H: H Aromatiques 6 - 1' H₄ et 1' H₅), 7.87 (d, J=4 Hz, 1H: 1' H₆), 8.55 (mf, 1H: NH 6), 8.55 (d, J= 10 Hz, 1H: 20 NH 1), 11.70 (s, 1H: OH).

A partir des fractions issues de la colonne de silice décrite ci-dessus, contenant le nouveau dérivé de pristinamycine I , 3 mg de 5 γ -hydroxy 4 ζ -méthylthio-dés(4 ζ -diméthylamino) pristinamycine I_H sont isolés en opérant la chromatographie sur colonne semi-préparative comme décrite ci-dessus en gardant la proportion d'acétonitrile de la phase éluante à 45%.

Spectre de R.M.N. ¹ H (400 MHz, CDCl₃, δ en ppm, ref. TMS): on observe un isomère nettement majoritaire: le -OH en 5 γ en position axiale. 0.37 (d mt, J= 16 Hz, 1H, 5 β_2), 0.93 (t, J= 7.5 Hz, 3H: CH₃ 2 γ), de 1.20 à 1.45 (mt, 2H: 3 β_2 et 3 γ_2), 1.31 (d, J= 7.5 Hz, 3H: CH₃ 1 γ), de 1.40 à 1.85 (mt, 5H: 3 γ_1 - CH₂ 2 β et CH₂ 5 δ), 1.98 (mt, 1H, 3 β_1), 2.17 (d, J= 16 Hz, 1H: 5 β_1), 2.50 (s, 3H: SCH₃), 2.77 (dt, J= 13.5 et 2 Hz, 1H: 5 ϵ_2), 2.99 (dd, J= 12 et 4 Hz, 1H: 4 β_2), 3.11 (t, J= 12 Hz, 1H: 4 β_1), de 3.45 à 3.70 (mt, 2H: CH₂ 3 δ), 3.73 (mt, 1H: 5 γ en position équatoriale), 4.13 (t, J= 7 Hz, 1H, 3 α), 4.37 (d large, J= 13.5 Hz, 1H: 5 ϵ_1), de 4.75 à 4.95 (mt, 3H: 2 α - 4 α et 5 α), 4.89 (dd, J= 10 et 1 Hz, 1H: 1 α), 5.70 (d, J= 8 Hz, 1H: 6 α), 5.80 (dq,

J= 7.5 et 1 Hz, 1H: 1 β), 6.37 (d, J= 5 Hz, 1H: NH 4), 6.71 (d, J= 10 Hz, 1H: NH 2), 7.10 (d, J= 8 Hz, 2H: 4 δ), 7.22(d, J= 8 Hz, 2H: 4 ϵ), de 7.20 à 7.40 (mt, 5H: H Aromatiques 6), 7.43 (dd, J= 8.5 et 1.5 Hz, 1H: 1' H_a), 7.47 (dd, J= 8.5 et 4 Hz, 1H: 1' H_b), 7.89 (dd, J = 4 et 1.5 Hz, 1H: 1' H_c), 8.55 (d, J= 10 Hz, 1H: NH 1), 9.15 (d, J= 5 Hz, 1H: NH 6), 11.70 (s, 1H: OH).

EXEMPLE 6: Préparation de la 4 ζ -méthyl-dés(4 ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A et de la 4 ζ -méthyl-dés(4 ζ -diméthylamino) pristinamycine I_H.

On réalise à l'échelle de 60 erlenmeyers comme décrit dans l'exemple 3 une culture de la souche SP92::pVRC508 en milieu de production avec ajout à 16h de 1 ml d'une solution à 5 g/l dans la soude 0,1N de 4-méthylphénylalanine (R,S). Au terme de 40 h de culture, les 1,8 litres de moût issus de 60 erlenmeyers sont extraits par 2 volumes d'un mélange de 66% de tampon phosphate 100 mM pH 2,9 et 34% d'acétonitrile, puis centrifugés. Le surnageant est extrait par 2 fois 0,5 volumes de dichlorométhane. Les phases chlorométhyléniques sont lavées à l'eau puis combinées, séchées sur sulfate de sodium et évaporées. L'extrait sec est repris par 20 ml de dichlorométhane et injecté sur une colonne de silice (30g) montée dans le dichlorométhane et éluée successivement par paliers de 0 à 10 % de méthanol dans le dichlorométhane. Les fractions contenant le nouveau dérivé de pristinamycine I_A sont regroupées et évaporées. On obtient 49 mg de résidu sec. Celui-ci est repris par 6 ml d'un mélange 60% eau et 40% acétonitrile et injecté en 2 fois sur une colonne semi-préparative Nucléosil 7 μ C8 10x250 mm (Macherey Nagel) éluée dans un mélange de 55% de tampon phosphate 100 mM pH 2,9 et 45% d'acétonitrile. Les fractions contenant la nouvelle pristinamycine sont regroupées et extraites par un volume de dichlorométhane. La phase organique est lavée à l'eau, séchée sur sulfate de sodium puis évaporée. On obtient 44 mg de 4 ζ -méthyl-dés(4 ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A.

Spectre de R.M.N. ¹ H (400 MHz, CDCl₃, δ en ppm, ref. TMS): 0.52 (dd, J= 16 et 6 Hz, 1H, 5 β ₂), 0.93 (t, J= 7.5 Hz, 3H: CH₃, 2 γ), 1.15 (mt, 1H: 3 β ₂), de 1.20 à 1.40 (mt, 1H: 3 γ ₂), 1.35 (d, J= 7.5 Hz, 3H: CH₃ 1 γ), de 1.50 à 1.85 (mt, 3H: 3 γ ₁ et CH₂ 2 β ₁), 2.04 (mt, 1H, 3 β ₁), 2.18 (mt, 1H, 5 δ ₂), de 2.25 à 2.45 (mt, 2H: 5 δ ₁ et 5 β ₁), 2.36 (s, 3H: ArCH₃), 2.83 (dt, J= 13 et 4 Hz, 1H: 5 ϵ ₂), 2.99 (dd, J= 13 et 4 Hz, 1H: 4 β ₂), 3.28 (s, 3H: NCH₃ 4), 3.31 et 3.59 (2 mts, 1H chacun: CH₂ 3 δ), 3.40 (t, J=

13 Hz, 1H: 4 β_1), 4.59 (t, J= 7.5 Hz, 1H, 3 α), 4.74 (dd large, J= 13 et 7 Hz, 1H: 5 ε_1), 4.85 (mt, 1H: 2 α), 4.89 (d large, J= 10 Hz, 1H: 1 α), de 5.25 à 5.35 (mt, 2H: 5 α et 4 α), de 5.85 à 5.95 (mt, 2H: 6 α et 1 β), 6.52 (d, J= 9.5 Hz, 1H: NH 2), 7.14 (AB limite, J= 9 Hz, 4H: 4 δ et 4 ε), de 7.15 à 7.35 (mt, 5H: H Aromatiques 6), 7.50 (mt, 5H: 1' H₄ et 1' H₅), 7.81 (dd, J = 4 et 2Hz, 1H: 1' H₆), 8.41 (d, J= 10 Hz, 1H: NH 1), 8.74 (d, J= 9 Hz, 1H: NH 6), 11.63 (s, 1H: OH).

A partir des fractions issues de la colonne de silice décrite ci-dessus, contenant le nouveau dérivé de pristinamycine I_H, 21 mg de 4 ζ -méthyl-dés(4 ζ -diméthylamino) pristinamycine I_H (spectrométrie de masse: M+H⁺= 810) sont isolés en opérant la chromatographie sur colonne semi-préparative comme décrit ci-dessus.

EXEMPLE 7: Préparation de la 4 ζ -méthoxy-dés(4 ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A.

On réalise à l'échelle de 12 erlenmeyers comme décrit dans l'exemple 3 une culture de la souche SP92::pVRC508 en milieu de production avec ajout à 16h de 1 ml d'une solution à 5 g/l dans la soude 0,1N de 4-méthoxyphénylalanine (R,S). Au terme de 40 h de culture, les 0,35 litres de moût issus de 12 erlenmeyers sont extraits par 2 volumes d'un mélange de 66% de tampon phosphate 100 mM pH 2,9 et 34% d'acétonitrile, puis centrifugés. Le surnageant est extrait par 2 fois 0,5 volumes de dichlorométhane. Les phases chlorométhyléniques sont lavées à l'eau puis combinées, séchées sur sulfate de sodium et évaporées. L'extrait sec est repris par 20 ml de dichlorométhane et injecté sur une colonne de silice (30g) montée dans le dichlorométhane et éluée successivement par paliers de 0 à 10 % de méthanol dans le dichlorométhane. Les fractions contenant le nouveau dérivé de pristinamycine I_A sont regroupées et évaporées. On obtient 14 mg de résidu sec. Celui-ci est repris par 3 ml d'un mélange 60% eau et 40% acétonitrile et injecté sur une colonne semi-préparative Nucléosil 7 μ C8 10x250 mm (Macherey Nagel) éluée dans un mélange de 60% de tampon phosphate 100 mM pH 2,9 et 40% d'acétonitrile. Les fractions contenant la nouvelle pristinamycine sont regroupées et extraites par un volume de dichlorométhane. La phase organique est lavée à l'eau, séchée sur sulfate de sodium puis évaporée. On obtient 12 mg de 4 ζ -méthoxy-dés(4 ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A.

Spectre de R.M.N. ^1H (400 MHz, CDCl_3 , d en ppm, ref. TMS): 0.63 (dd, $J=16$ et 5.5 Hz, 1H, 5 β_2), 0.96 (t, $J=7.5$ Hz, 3H: CH_3 2 γ), 1.17 (mt, 1H: 3 β_2), de 1.30 à 1.45 (mt, 1H: 3 γ_2), 1.38 (d, $J=7.5$ Hz, 3H: CH_3 1 γ), de 1.55 à 1.85 (mt, 3H: 3 γ_1 et CH_2 2 β), 2.05 (mt, 1H, 3 β_1), 2.20 (mt, 1H, 5 δ_2), 2.40 (d large, $J=16$ Hz, 1H: 5 δ_1), 2.47 (d, $J=16$ Hz, 1H: 5 β_1), 2.88 (dt, $J=13$ et 4 Hz, 1H: 5 ϵ_2), 2.99 (dd, $J=12.5$ et 5 Hz, 1H: 4 β_2), 3.30 (s, 3H: NCH_3 4), 3.32 et 3.60 (2 mts, 1H chacun: CH_2 3 δ), 3.40 (t, $J=12.5$ Hz, 1H: 4 β_1), 3.80 (s, 3H: OCH_3), 4.60 (t, $J=7.5$ Hz, 1H, 3 α), 4.80 (dd large, $J=13$ et 8.5 Hz, 1H: 5 ϵ_1), 4.88 (mt, 1H: 2 α), 4.92 (d large, $J=10$ Hz, 1H: 1 α), 5.31 (dd, $J=12.5$ et 5 Hz, 1H: 4 α), 5.34 (d large, $J=5.5$ Hz, 1H: 5 α), 5.90 (d, $J=9$ Hz, 1H: 6 α), 5.93 (q large, $J=7.5$ Hz, 1H: 1 β), 6.54 (d, $J=9$ Hz, 1H: NH 2), 6.87 (d, $J=8$ Hz, 2H: 4 ϵ), 7.16 (d, $J=8$ Hz, 2H: 4 δ), de 7.15 à 7.40 (mt, 5H: H Aromatiques 6), 7.50 (mt, 2H: 1' H_5 et 1' H_4), 7.80 (dd, $J=4$ et 2.5 Hz, 1H: 1' H_6), 8.43 (d, $J=10$ Hz, 1H: NH 1), 8.78 (d, $J=9$ Hz, 1H: NH 6), 11.65 (s, 1H: OH).

15

EXEMPLE 8: Préparation de la 4ζ -méthoxycarbonyl-dés(4ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A.

On réalise à l'échelle de 60 erlenmeyers comme décrit dans l'exemple 3 une culture de la souche SP92::pVRC508 en milieu de production avec ajout à 16h de 1 ml d'une solution à 10 g/l de 4-méthoxycarbonylphénylalanine (R,S) synthétisée comme à l'exemple 33. Au terme de 24 h de culture, les 1,8 litres de moût issus de 60 erlenmeyers sont extraits par 2 volumes d'un mélange de 66% de tampon phosphate 100 mM pH 2,9 et 34% d'acétonitrile, puis centrifugés. Le surnageant est extrait par 2 fois 0,5 volumes de dichlorométhane. Les phases chlorométhéniques sont lavées à l'eau puis combinées, séchées sur sulfate de sodium et évaporées. L'extrait sec est repris par 20 ml de dichlorométhane et injecté sur une colonne de silice (30g) montée dans le dichlorométhane et éluée successivement par paliers de 0 à 10 % de méthanol dans le dichlorométhane. Les fractions contenant le nouveau dérivé de pristinamycine I_A sont regroupées et évaporées. On obtient 14 mg de résidu sec. Celui-ci est repris par 3 ml d'un mélange 60% eau et 40% acétonitrile et injecté sur une colonne semi-préparative Nucléosil 7 μ C8 10x250 mm (Macherey Nagel) éluée dans un mélange de 55% de tampon phosphate 100 mM pH 2,9 et 45% d'acétonitrile. Les fractions contenant la nouvelle pristinamycine sont regroupées et extraites par un volume de

30

35

dichlorométhane. La phase organique est lavée à l'eau, séchée sur sulfate de sodium puis évaporée. On obtient 9 mg de 4ζ -méthoxycarbonyl-dés(4ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A.

Spectre de R.M.N. ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ en ppm, ref. TMS): 0.70 (dd, 5 J= 16 et 6 Hz, 1H, 5 β_2), 0.93 (t, J= 7.5 Hz, 3H: CH₃ 2 γ), 1.08 (mt, 1H: 3 β_2), de 1.30 à 1.40 (mt, 1H: 3 γ_2), 1.33 (d, J= 7.5 Hz, 3H: CH₃ 1 γ), de 1.55 à 1.85 (mt, 3H: 3 γ_1 et CH₂ 2 β), 2.02 (mt, 1H, 3 β_1), 2.13 (mt, 1H, 5 δ_2), 2.40 (d large, J= 16.5 Hz, 1H: 5 δ_1), 2.48 (d, J= 16 Hz, 1H, 5 β_1), 2.89 (dt, J= 14.5 et 4.5 Hz, 1H: 5 ϵ_2), 3.10 (dd, J= 13.5 et 6 Hz, 1H: 4 β_2), 3.24 (s, 3H: NCH₃ 4), 3.38 et 3.61 (2 mts, 1H chacun: CH₂ 3 δ), 3.47 (t, J= 13.5 Hz, 1H: 4 β_1), 3.96 (s, 3H: COOCH₃), 4.55 (t, J= 7.5 Hz, 1H, 3 α), 4.78 (dd large, J= 14.5 et 8 Hz, 1H: 5 ϵ_1), 4.86 (mt, 1H: 2 α), 4.89 (d large, J= 10 Hz, 1H: 1 α), 5.33 (d large, J= 6 Hz, 1H: 5 α), 5.42 (dd, J= 13.5 et 6 Hz, 1H: 4 α), 5.92 (d (J= 9.5 Hz) et mt, 1H chacun: respectivement 6 α et 1 β), 6.52 (d, J= 10 Hz, 1H: NH 2), de 7.15 à 7.35 (mt, 5H: H Aromatiques 6), 7.28 (d, J= 8 Hz, 2H: 4 δ), 15 7.43 (dd, J= 9 et 1.5 Hz, 1H: 1' H₄), 7.47 (dd, J= 9 et 5 Hz, 1H: 1' H₅), 7.66 (d, J= 5 et 1.5 Hz, 1H: 1' H₆), 7.98 (d, J= 8 Hz, 2H: 4 ϵ), 8.38 (d, J= 10 Hz, 1H: NH 1), 8.76 (d, J= 9.5 Hz, 1H: NH 6), 11.70 (s, 1H: OH).

EXEMPLE 9: Préparation de la 4ζ -chloro-dés(4ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A.

On réalise à l'échelle de 60 erlenmeyers comme décrit dans l'exemple 3 une culture de la souche SP92::pVRC508 en milieu de production avec ajout à 16h de 1 ml d'une solution à 10 g/l dans la soude 0,1N de 4-chlorophénylalanine (R,S). Au terme de 40 h de culture, les 1,8 litres de moût issus de 60 erlenmeyers sont extraits par 2 volumes d'un mélange de 66% de tampon phosphate 100 mM pH 2,9 et 34% d'acétonitrile, puis centrifugés. Le surnageant est extrait par 2 fois 0,5 volumes de dichlorométhane. Les phases chlorométhyléniques sont lavées à l'eau puis combinées, séchées sur sulfate de sodium et évaporées. L'extrait sec est repris par 20 ml de dichlorométhane et injecté sur une colonne de silice (30g) montée dans le dichlorométhane et éluée successivement par paliers de 0 à 10 % de méthanol dans le dichlorométhane. Les fractions contenant le nouveau dérivé de pristinamycine I_A sont regroupées et évaporées. Le résidu sec est repris par 3 ml d'un mélange 60% eau et 40% acétonitrile et injecté sur une colonne semi-préparative Nucléosil 7 μ C8 30x250 mm (Macherey Nagel) éluée dans un mélange de 60% de tampon phosphate 35 10x250 mm (Macherey Nagel) éluée dans un mélange de 60% de tampon phosphate

100 mM pH 2,9 et 40% d'acétonitrile. Les fractions contenant la nouvelle pristinamycine sont regroupées et extraites par un volume de dichlorométhane. La phase organique est lavée à l'eau, séchée sur sulfate de sodium puis évaporée. On obtient 1 mg de 4 ζ -chloro-dés(4 ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A.

5 Spectre de R.M.N. ¹ H (400 MHz, CDCl₃, δ en ppm, ref. TMS): 0.93 (t, J= 7.5 Hz, 3H: CH₃ 2 γ), 0.95 (dd, J= 16 et 5 Hz, 1H, 5 β ₂), 1.09 (mt, 1H: 3 β ₂), de 1.20 à 1.40 (mt, 1H: 3 γ ₂), 1.35 (d, J= 7.5 Hz, 3H: CH₃ 1 γ), de 1.50 à 1.85 (mt, 3H: 3 γ ₁ et CH₂ 2 β ₁), 2.02 (mt, 1H, 3 β ₁), 2.17 (mt, 1H, 5 δ ₂), 2.43 (d large, J= 16 Hz, 1H: 5 δ ₁), 2.59 (d, J= 16 Hz, 1H, 5 β ₁), 2.90 (dt, J= 13.5 et 4 Hz, 1H: 5 ϵ ₂), 3.04 (dd, J= 13 et 6 Hz, 1H: 4 β ₂), 3.21 (s, 3H: 4 NCH₃), 3.36 (t, J= 13 Hz, 1H: 4 β ₁), 3.39 et 3.59 (2 mts, 1H chacun: CH₂ 3 δ), 4.53 (t, J= 7.5 Hz, 1H, 3 α), 4.76 (dd large, J= 13.5 et 8 Hz, 1H: 5 ϵ ₁), 4.86 (mt, 1H: 2 α), 4.87(d large, J= 10 Hz, 1H: 1 α), 5.38 (mt, 2H: 5 α et 4 α), 5.93 (mt, 2H: 6 α et 1 β), 6.52 (d, J= 10 Hz, 1H: NH 2), 7.12 (d, J = 8 Hz, 2H: 4 δ), de 7.15 à 7.35 (mt, 7H: H Aromatiques 6 et 4 ϵ), 7.38 (dd, J= 9 et 4.5 Hz, 1H: 1' H₂), 7.43 (d large, J= 9 Hz, 1H: 1' H₄), 7.68 (dd, J = 4.5 et 1 Hz, 1H: 1' H₂), 8.36 (d, J= 10 Hz, 1H: NH 1), 8.75 (d, J= 9 Hz, 1H: NH 6), 11.65 (s, 1H: OH).

20 EXEMPLE 10: Préparation de la 4 ζ -bromo-dés(4 ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A et de la 4 ζ -bromo-dés(4 ζ -diméthylamino) pristinamycine I_H.

On réalise à l'échelle de 60 erlenmeyers comme décrit dans l'exemple 3 une culture de la souche SP92::pVRC508 en milieu de production avec ajout à 16h de 1 ml d'une solution à 10 g/l dans la soude 0,1N de 4-bromophénylalanine (R,S). Au 25 terme de 40 h de culture, les 1,8 litres de moût issus de 60 erlenmeyers sont extraits par 2 volumes d'un mélange de 66% de tampon phosphate 100 mM pH 2,9 et 34% d'acétonitrile, puis centrifugés. Le surnageant est extrait par 2 fois 0,5 volumes de dichlorométhane. Les phases chlorométhyléniques sont lavées à l'eau puis combinées, séchées sur sulfate de sodium et évaporées. L'extrait sec est repris par 20 ml de dichlorométhane et injecté sur une colonne de silice (30g) montée dans le dichlorométhane et éluée successivement par paliers de 0 à 10 % de méthanol dans le dichlorométhane. Les fractions contenant le nouveau dérivé de pristinamycine I_A sont regroupées et évaporées. Le résidu sec est repris par 6 ml d'un mélange 60% eau et 40% acétonitrile et injecté en 2 fois sur une colonne semi-préparative Nucléosil 7 μ C8 10x250 mm (Macherey Nagel) éluée dans un mélange de 60% de tampon 30

35

phosphate 100 mM pH 2,9 et 40% d'acétonitrile. Les fractions contenant la nouvelle pristinamycine sont regroupées et extraites par un volume de dichlorométhane. La phase organique est lavée à l'eau, séchée sur sulfate de sodium puis évaporée. On obtient 6 mg de 4ζ -bromo-dés(4ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A.

- 5 Spectre de R.M.N. ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ en ppm, ref: TMS): 0.93 (t, J= 7.5 Hz, 3H: CH₃ 2 γ), 0.95 (dd, J= 16 et 5 Hz, 1H, 5 β_2), 1.10 (mt, 1H: 3 β_2), 1.35 (d, J= 7.5 Hz, 3H: CH₃ 1 γ), 1.36 (mt, 1H: 3 γ_2), de 1.50 à 1.85 (mt, 3H: 3 γ_1 et CH₂ 2 β), 2.02 (mt, 1H, 3 β_1), 2.18 (mt, 1H, 5 δ_2), 2.43 (d large, J= 16 Hz, 1H: 5 δ_1), 2.59 (d, J=16 Hz, 1H, 5 β_1), 2.90 (dt, J= 13 et 4 Hz, 1H: 5 ϵ_2), 3.02 (dd, J= 13 et 5.5 Hz, 1H: 4 β_2), 3.21 (s, 3H: 4 NCH₃), 3.33 (dd, J= 13 - 11 Hz, 1H: 4 β_1), 3.39 et 3.59 (2 mts, 1H chacun: CH₂ 3 δ), 4.53 (t, J= 7.5-Hz, 1H, 3 α), 4.76 (dd large, J= 13 et 7 Hz, 1H: 5 ϵ_1), 4.86 (mt, 1H: 2 α), 4.89 (d large, J= 10 Hz, 1H: 1 α), 5.37 (d large, J= 5 Hz, 1H: 5 α), 5.39 (dd, J= 11 et 5.5 Hz, 1H: 4 α), 5.92 (mt, 2H: 6 α et 1 β), 6.56 (d, J= 9.5 Hz, 1H: NH 2), 7.08 (d, J = 8 Hz, 2H: 4 δ), de 7.15 à 7.35 (mt, 5H: H Aromatiques 6), 7.40 (mt, 4H: 1' H₄ - 1' H₅ et 4 ϵ), 7.70 (d large, J = 5 Hz, 1H: 1' H₆), 8.40 (d, J= 10 Hz, 1H: NH 1), 8.77 (d, J= 9 Hz, 1H: NH 6), 11.68 (s, 1H: OH).

- 20 A partir des fractions issues de la colonne de silice décrite ci-dessus, contenant le nouveau dérivé de pristinamycine I_H, 3 mg de 4ζ -bromo-dés(4ζ -diméthylamino) pristinamycine I_H (spectrométrie de masse: M+H⁺= 874) sont isolés en opérant la chromatographie sur colonne semi-préparative comme décrit ci-dessus.

EXEMPLE 11: Préparation de la 4ζ -iodo-dés(4ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A et de la 4ζ -iodo-dés(4ζ -diméthylamino) pristinamycine I_H.

- On réalise à l'échelle de 60 erlenmeyers comme décrit dans l'exemple 3 une culture de la souche SP92::pVRC508 en milieu de production avec ajout à 16h de 1 ml d'une solution à 10 g/l dans la soude de 4-iodophénylalanine (R,S). Au terme de 30 40 h de culture, les 1,8 litres de moût issus de 60 erlenmeyers sont extraits par 2 volumes d'un mélange de 66% de tampon phosphate 100 mM pH 2,9 et 34% d'acétonitrile, puis centrifugés. Le surnageant est extrait par 2 fois 0,5 volumes de dichlorométhane. Les phases chlorométhyléniques sont lavées à l'eau puis combinées, séchées sur sulfate de sodium et évaporées. L'extrait sec est repris par 20 ml de dichlorométhane et injecté sur une colonne de silice (30g) montée dans le

dichlorométhane et éluée successivement par paliers de 0 à 10 % de méthanol dans le dichlorométhane. Les fractions contenant le nouveau dérivé de pristinamycine I_A sont regroupées et évaporées. Le résidu sec est repris par 6 ml d'un mélange 60% eau et 40% acétonitrile et injecté en 2 fois sur une colonne semi-préparative Nucléosil 7μ C8 10x250 mm (Macherey Nagel) éluée dans un mélange de 60% de tampon phosphate 100 mM pH 2,9 et 40% d'acétonitrile. Les fractions contenant la nouvelle pristinamycine sont regroupées et extraites par un volume de dichlorométhane. La phase organique est lavée à l'eau, séchée sur sulfate de sodium puis évaporée. On obtient 12 mg de 4ζ-iodo-dés(4ζ-diméthylamino) pristinamycine I_A.

10 Spectre de R.M.N. ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ en ppm, ref. TMS): 0.93 (t, J= 7.5 Hz, 3H: CH₃ 2 γ), 0.95 (dd, J= 16 et 5.5 Hz, 1H, 5 β₂), 1.10 (mt, 1H: 3 β₂), 1.35 (d, J= 7.5 Hz, 3H: CH₃ 1 γ), 1.38 (mt, 1H: 3 γ₂), de 1.55 à 1.85 (mt, 3H: 3 γ₁ et CH₂ 2 β), 2.02 (mt, 1H, 3 β₁), 2.17 (mt, 1H, 5 δ₂), 2.43 (d large, J= 16.5 Hz, 1H: 5 δ₁), 2.60 (d, J= 16 Hz, 1H, 5 β₁), 2.89 (dt, J= 14 et 4.5 Hz, 1H: 5 ε₂), 3.02 (dd, J= 13 et 5.5 Hz, 1H: 4 β₂), 3.21 (s, 3H: NCH₃ 4), 3.31 (dd, J= 13 et 11 Hz, 1H: 4 β₁), 3.39 et 3.59 (2 mts, 1H chacun: CH₂ 3 δ), 4.53 (t, J= 7.5 Hz, 1H, 3 α), 4.75 (dd large, J= 14 et 8 Hz, 1H: 5 ε₁), 4.83 (mt, 1H: 2α), 4.88 (d large, J= 10 Hz, 1H: 1α), 5.37 (d large, J= 5.5 Hz, 1H: 5 α), 5.39 (dd, J= 11 et 5.5 Hz, 1H: 4 α), 5.92 (mt, 2H: 6 α et 1β), 6.54 (d, J= 9.5 Hz, 1H: NH 2), 6.94 (d, J= 7.5 Hz, 2H: 4δ), de 7.15 à 7.50 (mt, 5H: H Aromatiques 6), 7.36 (dd, J= 9 et 4 Hz, 1H: 1' H₅), 7.43 (d large, J= 9 Hz, 1H: 1' H₄), 7.62 (d, J= 7.5 Hz, 2H: 4ε), 7.68 (d, J= 4 Hz, 1H: 1' H₆), 8.38 (d, J= 10 Hz, 1H: NH 1), 8.76 (d, J= 9 Hz, 1H: NH 6), 11.60 (s, 1H: OH).

15

20

25 A partir des fractions issues de la colonne de silice décrite ci-dessus, contenant le nouveau dérivé de pristinamycine I_H, 6 mg de 4ζ-iodo-dés(4ζ-diméthylamino) pristinamycine I_H (spectrométrie de masse: M+H⁺= 922) sont isolés en opérant la chromatographie sur colonne semi-préparative comme décrit ci-dessus.

30 EXEMPLE 12: Préparation de la 4ζ-trifluorométhyl-dés(4ζ-diméthylamino) pristinamycine I_A et de la 4ζ-trifluorométhyl-dés(4ζ-diméthylamino) pristinamycine I_H.

35 On réalise à l'échelle de 60 erlenmeyers comme décrit dans l'exemple 3 une culture de la souche SP92::pVRC508 en milieu de production avec ajout à 16h de 1 ml d'une solution à 5 g/l dans la soude 0,1N de 4-trifluorométhylphénylalanine (S).

Au terme de 40 h de culture, les 1,8 litres de moût issus de 60 erlenmeyers sont extraits par 2 volumes d'un mélange de 66% de tampon phosphate 100 mM pH 2,9 et 34% d'acétonitrile, puis centrifugés. Le surnageant est extrait par 2 fois 0,5 volumes de dichlorométhane. Les phases chlorométhyléniques sont lavées à l'eau puis combinées, séchées sur sulfate de sodium et évaporées. L'extrait sec est repris par 20 ml de dichlorométhane et injecté sur une colonne de silice (30g) montée dans le dichlorométhane et éluée successivement par paliers de 0 à 10 % de méthanol dans le dichlorométhane. Les fractions contenant le nouveau dérivé de pristinamycine I_A sont regroupées et évaporées. Le résidu sec est repris par 3 ml d'un mélange 60% eau et 40% acétonitrile et injecté sur une colonne semi-préparative Nucléosil 7μ C8 10x250 mm (Macherey Nagel) éluée dans un mélange de 55% de tampon phosphate 100 mM pH 2,9 et 45% d'acétonitrile. Les fractions contenant la nouvelle pristinamycine sont regroupées et extraites par un volume de dichlorométhane. La phase organique est lavée à l'eau, séchée sur sulfate de sodium puis évaporée. On obtient 5 mg de 4ζ-trifluorométhyl-dés(4ζ-diméthylamino) pristinamycine I_A.

Spectre de R.M.N. ¹ H (400 MHz, CDCl₃, δ en ppm, ref. TMS): 0.86 (dd, J= 16 et 5.5 Hz, 1H, 5 β₂), 0.91 (t, J= 7.5 Hz, 3H: CH₃ 2 γ), 1.13 (mt, 1H: 3 β₂), 1.31 (d, J= 7.5 Hz, 3H: CH₃ 1 γ), 1.42 (mt, 1H: 3 γ₂), de 1.55 à 1.80 (mt, 3H: 3 γ₁ et CH₂ 2 β), 2.02 (mt, 1H, 3 β₁), 2.15 (mt, 1H, 5 δ₂), 2.40 (d large, J= 16.5 Hz, 1H: 5 δ₁), 2.55 (d, J= 16 Hz, 1H, 5 β₁), 2.88 (dt, J= 14 et 4 Hz, 1H: 5 ε₂), 3.18 (s, 3H: NCH₃ 4), 3.20 et 3.31 (2 dd, respectivement J= 13 et 6 Hz et J= 13 et 10 Hz, 1H chacun: 4 β₂ et 4 β₁), 3.42 et 3.60 (2 mts, 1H chacun: CH₂ 3 δ), 4.50 (t, J= 7.5 Hz, 1H, 3 α), 4.73 (dd large, J= 14 et 7.5 Hz, 1H: 5 ε₁), 4.83 (mt, 1H: 2α), 4.91 (d large, J= 10 Hz, 1H: 1α), 5.40 (d large, J= 5.5 Hz, 1H: 5 α), 5.55 (dd, J= 10 et 6 Hz, 1H: 4 α), 5.87 (d, J= 9.5 Hz, 1H: 6 α), 5.90 (q large, J= 7.5 Hz, 1H: 1β), 6.68 (d, J= 9.5 Hz, 1H: NH 2), de 7.15 à 7.40 (mt, 9 H: 4δ - H Aromatiques 6 - 1' H₅ et 1' H₄), 7.52 (d, J= 8 Hz, 2H: 4ε), 7.68 (d, J= 4 et 1.5 Hz, 1H: 1' H₆), 8.43 (d, J= 10 Hz, 1H: NH 1), 8.76 (d, J= 9.5 Hz, 1H: NH 6), 11.70 (s, 1H: OH).

A partir des fractions issues de la colonne de silice décrite ci-dessus, contenant le nouveau dérivé de pristinamycine I_H, 4 mg de ζ-trifluorométhyl-dés(4ζ-diméthylamino) pristinamycine I_H (spectrométrie de masse: M+H⁺= 864) sont isolés en opérant la chromatographie sur colonne semi-préparative comme décrit ci-dessus.

EXEMPLE 13: Préparation de la 4ζ -tert-butyl-dés(4ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A.

On réalise à l'échelle de 60 erlenmeyers comme décrit dans l'exemple 3 une culture de la souche SP92::pVRC508 en milieu de production avec ajout à 16h de 1 ml d'une solution à 5 g/l dans la soude 0,1N de 4-tert-butylphénylalanine(R,S) synthétisée comme à l'exemple 35-1. Au terme de 40 h de culture, les 1,8 litres de moût issus de 60 erlenmeyers sont extraits par 2 volumes d'un mélange de 66% de tampon phosphate 100 mM pH 2,9 et 34% d'acétonitrile, puis centrifugés. Le surnageant est extrait par 2 fois 0,5 volumes de dichlorométhane. Les phases chlorométhyléniques sont lavées à l'eau puis combinées, séchées sur sulfate de sodium et évaporées. L'extrait sec est repris par 20 ml de dichlorométhane et injecté sur une colonne de silice (30g) montée dans le dichlorométhane et éluée successivement par paliers de 0 à 10 % de méthanol dans le dichlorométhane. Les fractions contenant le nouveau dérivé de pristinamycine I_A sont regroupées et évaporées. Le résidu sec est repris par 7 ml d'un mélange 60% eau et 40% acétonitrile et injecté en 2 fois sur une colonne semi-préparative Nucléosil 7μ C8 10x250 mm (Macherey Nagel) éluée dans un mélange de 55% de tampon phosphate 100 mM pH 2,9 et 45% d'acétonitrile. Les fractions contenant la nouvelle pristinamycine sont regroupées et extraites par un volume de dichlorométhane. La phase organique est lavée à l'eau, séchée sur sulfate de sodium puis évaporée. On obtient 30 mg de 4ζ -tert-butyl-dés(4ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A.

Spectre de R.M.N. ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ en ppm, ref. TMS, ref. TMS): 0.21 (dd, J= 16 et 5.5 Hz, 1H, 5 β₂), 0.91 (t, J= 7.5 Hz, 3H: CH₃, 2 γ), 1.17 (mt, 1H: 3 β₂), de 1.20 à 1.40 (mt, 1H: 3 γ₂), 1.33 (s, 9H: CH₃ du tert-butyle), 1.35 (d, J= 7.5 Hz, 3H: CH₃, 1 γ), de 1.50 à 1.85 (mt, 3H: 3 γ₁ et CH₂, 2 β), 2.04 (mt, 1H, 3 β₁), 2.13 (mt, 1H, 5 δ₂), 2.30 (mt, 2H: 5 δ₁ et 5 β₁), 2.80 (dt, J= 13 et 4 Hz, 1H: 5 ε₂), 3.00 (dd, J= 12 et 4 Hz, 1H: 4 β₂), 3.29 (s, 3H: NCH₃, 4), 3.31 et 3.59 (2 mts, 1H chacun: CH₂, 3 δ), 3.40 (t, J= 12 Hz, 1H: 4 β₁), 4.57 (t, J= 7.5 Hz, 1H, 3 α), 4.74 (dd large, J= 13 et 7 Hz, 1H: 5 ε₁), 4.85 (mt, 1H: 2α), 4.90 (d large, J= 10 Hz, 1H: 1α), 5.21 (d large, J= 5.5 Hz, 1H: 5 α), 5.25 (dd, J= 12 et 4 Hz, 1H: 4 α), 5.87 (d, J= 9 Hz, 1H: 6 α), 5.92 (q large, J= 7.5 Hz, 1H: 1

1H: 1' H_o), 8.45 (d, J= 10 Hz, 1H: NH 1), 8.74 (d, J= 9 Hz, 1H: NH 6), 11.65 (s, 1H: OH).

5 **EXEMPLE 14: Préparation de la 4 ζ -isopropyl-dés(4 ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A. et de la 4 ζ -isopropyl-dés(4 ζ -diméthylamino) pristinamycine I_E.**

On réalise à l'échelle de 60 erlenmeyers comme décrit dans l'exemple 3 une culture de la souche SP92::pVRC508 en milieu de production avec ajout à 16h de 1 ml d'une solution à 10 g/l dans la soude 0,1N de 4-isopropylphénylalanine (R,S) synthétisée comme à l'exemple 36-1. Au terme de 40 h de culture, les 1,8 litres de moût issus de 60 erlenmeyers sont extraits par 2 volumes d'un mélange de 66% de tampon phosphate 100 mM pH 2,9 et 34% d'acétonitrile, puis centrifugés. Le surnageant est extrait par 2 fois 0,5 volumes de dichlorométhane. Les phases chlorométhyléniques sont lavées à l'eau puis combinées, séchées sur sulfate de sodium et évaporées. L'extrait sec est repris par 20 ml de dichlorométhane et injecté sur une colonne de silice (30g) montée dans le dichlorométhane et éluée successivement par paliers de 0 à 10 % de méthanol dans le dichlorométhane. Les fractions contenant le nouveau dérivé de pristinamycine I_A sont regroupées et évaporées. On obtient 61 mg de résidu sec. Celui-ci est repris par 9 ml d'un mélange 60% eau et 40% acétonitrile et injecté en 3 fois sur une colonne semi-préparative Nucléosil 7 μ C8 10x250 mm (Macherey Nagel) éluée dans un mélange de 55% de tampon phosphate 100 mM pH 2,9 et 45% d'acétonitrile. Les fractions contenant la nouvelle pristinamycine sont regroupées et extraites par un volume de dichlorométhane. La phase organique est lavée à l'eau, séchée sur sulfate de sodium puis évaporée. On obtient 51 mg de 4 ζ -isopropyl-dés(4 ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A.

Spectre de R.M.N. ¹ H (250 MHz, CDCl₃, δ en ppm, ref. TMS, ref. TMS):
 30 0.31 (dd, J= 16 et 5.5 Hz, 1H, 5 β_2), 0.91 (t, J= 7.5 Hz, 3H: CH₃ 2 γ), de 1.00 à 1.45 (mt, 2H: 3 β_2 et 3 γ_2), 1.25 (d, J= 7.5 Hz, 6H: CH₃ de l' isopropyle), 1.35 (d, J= 7.5 Hz, 3H: CH₃ 1 γ), de 1.50 à 1.85 (mt, 3H: 3 γ_1 et CH₂ 2 β), de 1.95 à 2.20 (mt, 2H, 3 β_1 et 5 δ_2), 2.30 (mt, 2H: 5 δ_1 et 5 β_1), 2.80 (dt, J= 13 et 4 Hz, 1H: 5 ε_2), 2.88 (mt, 1H: CH de l' isopropyle), 2.98 (dd, J= 12 et 4 Hz, 1H: 4 β_2), 3.30 (s, 3H: NCH₃ 4), 3.32 et
 35 3.55 (2 mts, 1H chacun: CH₂ 3 δ), 3.38 (t, J= 12 Hz, 1H: 4 β_1), 4.55 (t, J= 7.5 Hz,

1H, 3 α), 4.72 (dd large, J= 13 et 7 Hz, 1H: 5 ϵ_1), 4.85 (mt, 1H: 2 α), 4.88 (d large, J= 10 Hz, 1H: 1 α), 5.21 (d large, J= 5.5 Hz, 1H: 5 α), 5.25 (dd, J= 12 et 4 Hz, 1H: 4 α), 5.87(d, J= 9 Hz, 1H: 6 α), 5.90 (q large, J= 7.5 Hz, 1H: 1 β), 6.50 (d, J= 9.5 Hz, 1H: NH 2), de 7.05 à 7.35 (mt, 9H: H Aromatiques 6 - 4 ϵ et 4 δ), 7.50 (mt, 2H: 1' H₅ et 1' H₄), 7.86 (dd, J = 4 et 1.5 Hz, 1H: 1' H₆), 8.40 (d, J= 10 Hz, 1H: NH 1), 8.72 (d, J= 9 Hz, 1H: NH 6), 11.60 (s, 1H: OH).

A partir des mêmes fractions issues de la colonne de silice décrite ci-dessus, contenant également le nouveau dérivé de pristinamycine I_E, 5 mg de ζ -isopropyl-dés(4 ζ -diméthylamino) pristinamycine I_E sont isolés en opérant la chromatographie sur colonne semi-préparative comme décrit ci-dessus.

Spectre de R.M.N. ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ en ppm, ref. TMS): 0.20 (mt, 1H, 5 β_2), 0.92 (t, J= 7.5 Hz, 3H: CH₃ 2 γ), de 1.15 à 1.40 (mt, 2H: 3 β_2 et 3 γ_2), 1.24(d, J= 7.5 Hz, 6H: CH₃ de l'isopropyle), 1.34 (d, J= 7.5 Hz, 3H: CH₃ 1 γ), de 1.35 à 2.05 (mt, 9H: 3 γ_1 - 3 β_1 - CH₂ 2 β - CH₂ 5 δ - CH₂ 5 γ et 5 β_1), 2.45 (dt, J= 13 et 1.5 Hz, 1H: 5 ϵ_2), 2.89 (mt, 1H: ArCH), 3.09 (dd, J= 14 et 7 Hz, 1H: 4 β_2), 3.17 (s, 3H: NCH₃ 4), 3.25 (dd, J= 14 et 9 Hz, 1H: 4 β_1), 3.32 et 3.52 (2 mts, 1H chacun: CH₂ 3 δ), 4.55 (mt, 2H: 3 α et 5 ϵ_1), 4.80 (mt, 1H: 2 α), 4.89 (dd, J= 10 et 1.5 Hz, 1H: 1 α), 4.90 (mt, 1H: 5 α), 5.35 (dd, J= 9 et 7 Hz, 1H: 4 α), 5.60 (d, J= 8 Hz, 1H: 6 α), 5.89 (dq, J= 7.5 et 1.5 Hz, 1H: 1 β), 6.65 (d, J= 9.5 Hz, 1H: NH 2), 7.08 (d, J= 8 Hz, 2H: 4 δ), 7.14 (d, J= 8 Hz, 2H: 4 ϵ), de 7.20 à 7.40 (mt, 7H: H Aromatiques 6 - 1' H₄ et 1' H₅), 7.77 (d large, J= 4 Hz, 1H: 1' H₆), 8.46 (d, J= 10 Hz, 1H: NH 1), 8.48 (d, J= 8 Hz, 1H: NH 6), 11.70 (s, 1H: OH).

25

EXEMPLE 15 : Préparation de la 4 ϵ -méthylamino-dés(4 ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A.

On réalise à l'échelle de 60 erlenmeyers comme décrit dans l'exemple 3 une culture de la souche SP92::pVRC508 en milieu de production avec ajout à 16h de 1 ml d'une solution à 10 g/l dans l'eau de 3-méthylaminophénylalanine (R,S) synthétisée comme à l'exemple 35-3. Au terme de 40 h de culture, les 1,8 litres de moût issus de 60 erlenmeyers sont extraits par 2 volumes d'un mélange de 66% de tampon phosphate 100 mM pH 2,9 et 34% d'acetonitrile, puis centrifugés. Le surnageant est extrait par 2 fois 0,5 volumes de dichlorométhane. Les phases

chlorométhyléniques sont lavées à l'eau puis combinées, séchées sur sulfate de sodium et évaporées. L'extrait sec est repris par 20 ml de dichlorométhane et injecté sur une colonne de silice (30g) montée dans le dichlorométhane et éluée successivement par paliers de 0 à 10 % de méthanol dans le dichlorométhane. Les 5 fractions contenant le nouveau dérivé de pristinamycine I_A sont regroupées et évaporées. On obtient 19 mg de résidu sec. Celui-ci est repris par 3 ml d'un mélange 60% eau et 40% acetonitrile et injecté sur une colonne semi-préparative Nucléosil 7μ C8 10x250 mm (Macherey Nagel) éluée dans un mélange de 55% de tampon phosphate 100 mM pH 2,9 et 45% d'acetonitrile. Les fractions contenant la nouvelle 10 pristinamycine sont regroupées et extraites par un volume de dichlorométhane. La phase organique est lavée à l'eau, séchée sur sulfate de sodium puis évaporée. On obtient 8 mg de 4ε-méthylamino-dés(4ζ-diméthylamino) pristinamycine I_A.

Spectre de R.M.N. ¹ H (400 MHz, CDCl₃, δ en ppm, ref. TMS): 0.93 (t, J= 7.5 Hz, 3H: CH₃ 2 γ), 1.00 (dd, J= 16 et 6 Hz, 1H, 5 β₂), 1.17 (mt, 1H: 3 β₂), de 15 1.25 à 1.40 (mt, 2H: 3 γ₂), 1.35 (d, J= 7.5 Hz, 3H: CH₃ 1 γ), de 1.55 à 1.80 (mt, 3H: 3 γ₁ et CH₂ 2 β), 2.03 (mt, 1H, 3 β₁), 2.23 (mt, 1H, 5 δ₂), 2.39 (d large, J= 16 Hz, 1H: 5 δ₁), 2.52 (d, J= 16 Hz, 1H: 5 β₁), 2.78 (s, 3H: ArNCH₃ 4), 2.85 (dt, J= 13 et 4 Hz, 1H: 5 ε₂), 2.99 (dd, J= 13 et 4.5 Hz, 1H: 4 β₂), 3.23 (s, 3H: NCH₃ 4), 3.25 (t, J= 13 Hz, 1H: 4 β₁), 3.38 et 3.58 (2 mts, 1H chacun: CH₂ 3 δ), 4.05 (mf, 1H: ArNH), 4.58 20 (dd, J= 6.5 et 7.5 Hz, 1H, 3 α), 4.76 (dd large, J= 13 et 8 Hz, 1H: 5 ε₁), 4.85 (mt, 1H: 2α), 4.87 (d large, J= 10 Hz, 1H: 1α), 5.35 (dd, J= 13 et 4.5 Hz, 1H: 4 α), 5.38 (d large, J= 6 Hz, 1H: 5 α), 5.90 (d, J= 9.5 Hz, 1H: 6 α), 5.91 (mt, 1H: 1β), 6.36 (s large, 1H: H 2 de l' aromatique en 4), de 6.45 à 6.55 (mt, 2H: H 4 et H 6 de l' aromatique en 4), 6.53 (d, J= 10 Hz, 1H: NH 2), 7.12 (t, J= 8 Hz, 1H: H 5 de l' 25 aromatique en 4), de 7.15 à 7.45 (mt, 5H: H Aromatiques 6), 7.35 (mt, 2H: 1' H₄ et 1' H₅), 7.75 (t, J = 3 Hz, 1H: 1' H₆), 8.40 (d, J= 10 Hz, 1H: NH 1), 8.78 (d, J= 9.5 Hz, 1H: NH 6), 11.60 (s, 1H: OH).

30 EXEMPLE 16: Préparation de la 4ε-méthoxy-dés(4ζ-diméthylamino) pristinamycine I A et de la 4ε-méthoxy-dés(4ζ-diméthylamino) pristinamycine I H.

35 On réalise à l'échelle de 60 erlenmeyers comme décrit dans l'exemple 3 une culture de la souche SP92::pVRC508 en milieu de production avec ajout à 16h de 1

ml d'une solution à 5 g/l dans la soude 0,1N de 3-méthoxyphénylalanine (S). Au terme de 40 h de culture, les 1,8 litres de moût issus de 60 erlenmeyers sont extraits par 2 volumes d'un mélange de 66% de tampon phosphate 100 mM pH 2,9 et 34% d'acetonitrile, puis centrifugés. Le surnageant est extrait par 2 fois 0,5 volumes de dichlorométhane. Les phases chlorométhyléniques sont lavées à l'eau puis combinées, séchées sur sulfate de sodium et évaporées. L'extrait sec est repris par 20 ml de dichlorométhane et injecté sur une colonne de silice (30g) montée dans le dichlorométhane et éluée successivement par paliers de 0 à 10 % de méthanol dans le dichlorométhane. Les fractions contenant le nouveau dérivé de pristinamycine IA 5 sont regroupées et évaporées. On obtient 41 mg de résidu sec. Celui-ci est repris par 6 ml d'un mélange 60% eau et 40% acetonitrile et injecté en 2 fois sur une colonne semi-préparative Nucléosil 7 μ C8 10x250 mm (Macherey Nagel) éluée dans un mélange de 55% de tampon phosphate 100 mM pH 2,9 et 45% d'acetonitrile. Les fractions contenant la nouvelle pristinamycine sont regroupées et extraites par un 10 volume de dichlorométhane. La phase organique est lavée à l'eau, séchée sur sulfate de sodium puis évaporée. On obtient 28 mg de 4 ϵ -méthoxy-dés(4 ζ -diméthylamino) 15 pristinamycine IA.

Spectre de R.M.N. 1 H (400 MHz, CDCl₃, δ en ppm, ref. TMS): 0.52 (dd, J= 16 et 5.5 Hz, 1H, 5 β_2), 0.90 (t, J= 7.5 Hz, 3H: CH₃ 2 γ), de 1.10 à 1.34 (mt, 2H: 3 β_2 et 3 γ_2), 1.34 (d, J= 7.5 Hz, 3H: CH₃ 1 γ), de 1.50 à 1.80 (mt, 3H: 3 γ_1 et CH₂ 2 β), 2.04 (mt, 1H, 3 β_1), 2.20 (mt, 1H, 5 δ_2), 2.35 (d large, J= 16 Hz, 1H: 5 δ_1), 2.38 (d, J= 16 Hz, 1H: 5 β_1), 2.83 (dt, J= 13 et 4 Hz, 1H: 5 ϵ_2), 2.97 (dd, J= 12 et 4 Hz, 1H: 4 β_2), 3.28 (s, 3H: NCH₃ 4), 3.28 et 3.56 (2 mts, 1H chacun: CH₂ 3 δ), 3.40 (t, J= 12 Hz, 1H: 4 β_1), 3.80 (s, 3H: OCH₃), 4.58 (t, J= 7.5 Hz, 1H, 3 α), 4.76 (dd large, J= 13 20 et 8 Hz, 1H: 5 ϵ_1), 4.85 (mt, 1H: 2 α), 4.90 (d large, J= 10 Hz, 1H: 1 α), 5.27 (dd, J= 12 et 4 Hz, 1H: 4 α), 5.30 (d large, J= 5.5 Hz, 1H: 5 α), 5.89 (d, J= 9.5Hz, 1H: 6 α), 5.91 (q large, J= 7.5 Hz, 1H: 1 β), 6.51 (d, J= 10 Hz, 1H: NH 2), de 6.80 à 6.90 (mt, 3H: H 2 - H 4 et H 6 de l' aromatique en 4), de 7.15 à 7.40 (mt, 6H: H 5 de l' aromatique en 4 et H Aromatiques 6), 7.45 (d large, J= 9 Hz, 1H: 1' H₄), 7.50 (dd, J= 9 et 4 Hz, 1H: 1' H₅), 7.80 (d large, J = 4 Hz, 1H: 1' H₆), 8.40 (d, J= 10 Hz, 1H: NH 1), 8.73 (d, J= 9.5 Hz, 1H: NH 6), 11.62 (s, 1H: OH).

A partir des fractions issues de la colonne de silice décrite ci-dessus, contenant le nouveau dérivé de pristinamycine I H, 7 mg de 4 ϵ -méthoxy-dés(4 ζ -

diméthylamino) pristinamycine I H (spectrométrie de masse: M+H⁺= 826) sont isolés en opérant la chromatographie sur colonne semi-préparative comme décrit ci-dessus.

EXEMPLE 17: Préparation de 4ε-fluoro 4ζ-méthyl-dés(4ζ-diméthylamino) pristinamycine I A.

On réalise à l'échelle de 60 erlenmeyers comme décrit dans l'exemple 3 une culture de la souche SP92::pVRC508 en milieu de production avec ajout à 16h de 1 ml d'une solution à 10 g/l dans la soude 0,1N de 3-fluoro 4-méthylphénylalanine (R,S) synthétisée comme à l'exemple 34-5. Au terme de 40 h de culture, les 1,8 litres de moût issus de 60 erlenmeyers sont extraits par 2 volumes d'un mélange de 66% de tampon phosphate 100 mM pH 2,9 et 34% d'acetonitrile, puis centrifugés. Le surnageant est extrait par 2 fois 0,5 volumes de dichlorométhane. Les phases chlorométhyléniques sont lavées à l'eau puis combinées, séchées sur sulfate de sodium et évaporées. L'extrait sec est repris par 20 ml de dichlorométhane et injecté sur une colonne de silice (30g) montée dans le dichlorométhane et éluée successivement par paliers de 0 à 10 % de méthanol dans le dichlorométhane. Les fractions contenant le nouveau dérivé de pristinamycine IA sont regroupées et évaporées. On obtient 15 mg de résidu sec. Celui-ci est repris par 3 ml d'un mélange 60% eau et 40% acetonitrile et injecté sur une colonne semi-préparative Nucléosil 7μ C8 10x250 mm (Macherey Nagel) éluée dans un mélange de 55% de tampon phosphate 100 mM pH 2,9 et 45% d'acetonitrile. Les fractions contenant la nouvelle pristinamycine sont regroupées et extraites par un volume de dichlorométhane. La phase organique est lavée à l'eau, séchée sur sulfate de sodium puis évaporée. On obtient 9 mg de 4ε-fluoro 4ζ-méthyl-dés(4ζ-diméthylamino) pristinamycine I A.

Spectre de R.M.N. ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ en ppm, ref. TMS): 0.60 (dd, J= 16 et 5.5 Hz, 1H, 5 β₂), 0.91 (t, J= 7.5 Hz, 3H: CH₃ 2 γ), 1.12 (mt, 1H: 3 β₂), de 1.25 à 1.35 (mt, 1H: 3 γ₂), 1.33 (d, J= 7.5 Hz, 3H: CH₃ 1 γ), de 1.50 à 1.85 (mt, 3H: 3 γ₁ et CH₂ 2 β), 2.02 (mt, 1H, 3 β₁), 2.13 (mt, 1H, 5 δ₂), 2.27 (s, 3H: ArCH₃), 2.36 (d large, J= 16 Hz, 1H: 5 δ₁), 2.45 (d, J= 16 Hz, 1H: 5 β₁), 2.85 (dt, J= 13 et 4.5 Hz, 1H: 5 ε₂), 2.97 (dd, J= 12.5 et 4.5 Hz, 1H: 4 β₂), 3.23 (s, 3H: NCH₃ 4), 3.30 et 3.56 (2 mts, 1H chacun: CH₂ 3 δ), 3.37 (t, J= 12.5 Hz, 1H: 4 β₁), 4.55 (t, J= 7.5 Hz, 1H, 3 α), 4.75 (dd large, J= 13 et 8 Hz, 1H: 5 ε₁), 4.83 (mt, 1H: 2α), 4.89 (d large, J= 10 Hz, 1H: 1α), 5.29 (dd, J= 12.5 et 4.5 Hz, 1H: 4 α), 5.32 (d large, J= 5.5 Hz, 1H: 5 α), 5.89 (d, J= 9.5 Hz, 1H: 6 α), 5.92 (mt, 1H: 1β), 6.49 (d, J= 10 Hz, 1H: NH 2), 6.90

(mt, 2H: H 2 et H 6 de l' aromatique en4), 7.11 (t, J= 8 Hz, 1H: H 5 de l' aromatique en 4), de 7.10 à 7.30 (mt, 5H: H Aromatiques 6), 7.43 (dd, J= 8.5 et 1 Hz, 1H: 1' H₄), 7.49 (dd, J= 8.5 et 4.5 Hz, 1H: 1' H₅), 7.75 (dd, J = 4.5 et 1Hz, 1H: 1' H₆), 8.48 (d, J= 10 Hz, 1H: NH 1), 8.70 (d, J= 9.5 Hz, 1H: NH 6), 11.60 (s, 1H: OH).

5

EXEMPLE 18 : Préparation de la 4 ζ -éthylamino-dés(4 ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A

10 On réalise à l'échelle de 50 erlenmeyers comme décrit dans l'exemple 3 une culture de la souche SP92::pVRC508 en milieu de production avec ajout à 16h de 1 ml d'une solution à 20 g/l dans la soude 0,1N de dichlorhydrate de 4-éthylaminophénylalanine (R,S) synthétisé comme à l'exemple 33. Au terme de 40 h de culture, les 1,5 litres de moût issus de 50 erlenmeyers sont extraits par 2 volumes d'un mélange de 66% de tampon phosphate 100 mM pH 2,9 et 34% d'acétonitrile, puis centrifugés. Le surnageant est extrait par 2 fois 0,5 volumes de dichlorométhane. Les phases chlorométhyléniques sont lavées à l'eau puis combinées, séchées sur sulfate de sodium et évaporées. L'extrait sec est repris par 20 ml de dichlorométhane et injecté sur une colonne de silice (30g) montée dans le dichlorométhane et éluée 15 successivement par paliers de 0 à 10 % de méthanol dans le dichlorométhane. Les fractions contenant la 4 ζ -éthylamino-dés (4 ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A sont regroupées et évaporées. Le résidu sec est repris par 7 ml d'un mélange 65% eau et 35% acétonitrile et injecté sur une colonne semi-préparative Nucléosil 7 μ C8 10x250 mm (Macherey Nagel) éluée dans un mélange de 60% de tampon phosphate 100 mM pH 2,9 et 40% d'acétonitrile. Les fractions contenant la 4 ζ -éthylamino-dés (4 ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A sont regroupées et extraites par un volume de dichlorométhane. La phase organique est lavée à l'eau, séchée sur sulfate de sodium puis évaporée. On obtient 10 mg de 4 ζ -éthylamino-dés(4 ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A.

20

25

30

35

Spectre de R.M.N. ¹ H (400 MHz, CDCl₃, δ en ppm, ref. TMS): 0,72 (dd, J = 16 et 6 Hz, 1H : 1H du CH₂ en 5 β) ; 0,90 (t, J = 7,5 Hz, 3H : CH₃ en 2 γ) ; 1,15 (mt, 1H : 1H du CH₂ en 3 β) ; de 1,20 à 1,40 (mt, 1H : 1H du CH₂ en 3 γ) ; 1,27 (t, J = 7,5 Hz, 3H : CH₃ de l'éthyle) ; 1,33 (d, J = 7 Hz, 3H : CH₃ en 1 γ) ; de 1,50 à 1,65 (mt, 1H : l'autre H du CH₂ en 3 γ) ; 1,60 et 1,74 (2 mts, 1H chacun : CH₂ en 2 β) ; 2,02 (mt,

1H : l'autre H du CH₂ en 3 β) ; 2,21 et 2,33 (respectivement mt et d large, J = 16,5 Hz, 1H chacun : CH₂ en 5 δ) ; 2,40 (d, J = 16 Hz, 1H : l'autre H du CH₂ en 5 β) ; 2,82 (dt, J = 13 et 4,5 Hz, 1H : 1H du CH₂ en 5 ε) ; 2,89 (dd, J = 12 et 4 Hz, 1H : 1H du CH₂ en 4 β) ; 3,10 (mt, 2H : NCH₂ de l'éthyle) ; de 3,20 à 3,35 (mt, 1H : 1H du CH₂ en 3 δ) ; 3,26 (s, 3H : NCH₃) ; 3,31 (t, J = 12 Hz, 1H : l'autre H du CH₂ en 4 β) ; 3,54 (mt, 1H : l'autre H du CH₂ en 3 δ) ; 3,67 (mf, 1H : NH) ; 4,56 (dd, J = 6,5 et 7 Hz, 1H : 3 α) ; 4,75 (dd large, J = 13 et 8 Hz, 1H : l'autre H du CH₂ en 5 ε) ; 4,84 (mt, 1H : 2 α) ; 4,90 (d large, J = 10 Hz, 1H : 1 α) ; 5,24 (dd, J = 12 et 4 Hz, 1H : 4 α) ; 5,32 (d large, J = 6 Hz, 1H : 5 α) ; 5,88 (d, J = 9,5 Hz, 1H : 6 α) ; 5,90 (mt, 1H : 1 β) ; 6,52 (d, J = 8 Hz, 3H : NH en 2 et H Aromatiques en 4 ε) ; 7,00 (d, J = 8 Hz, 2H : H Aromatiques en 4 δ) ; de 7,10 à 7,35 (mt, 5H : H Aromatiques en 6) ; 7,46 (AB limite, 2H : 1' H₄ et 1' H₅) ; 7,84 (dd, J = 4 et 1 Hz, 1H : 1' H₆) ; 8,45 (d, J = 10 Hz, 1H : NH en 1) ; 8,77 (d, J = 9,5 Hz, 1H : NH en 6) ; 11,65 (s, 1H : OH).

15

EXEMPLE 19 : Préparation de la 4ζ-diéthylamino-dés (4ζ-diméthylamino) pristinamycine I_A

On réalise à l'échelle de 50 erlenmeyers comme décrit dans l'exemple 3 une culture de la souche SP92::pVRC508 en milieu de production avec ajout à 16h de 1 ml d'une solution à 20 g/l dans la soude 0,1N de dichlorhydrate de 4-diéthylaminophénylalanine (R,S) synthétisé comme à l'exemple 33. Au terme de 40 h de culture, les 1,5 litres de moût issus de 50 erlenmeyers sont extraits par 2 volumes d'un mélange de 66% de tampon phosphate 100 mM pH 2,9 et 34% d'acétonitrile, puis centrifugés. Le surnageant est extrait par 2 fois 0,5 volumes de dichlorométhane. Les phases chlorométhyléniques sont lavées à l'eau puis combinées, séchées sur sulfate de sodium et évaporées. L'extrait sec est repris par 20 ml de dichlorométhane et injecté sur une colonne de silice (30g) montée dans le dichlorométhane et éluee successivement par paliers de 0 à 10 % de méthanol dans le dichlorométhane. Les fractions contenant la 4ζ-diéthylamino-dés (4ζ-diméthylamino) pristinamycine I_A sont regroupées et évaporées. Le résidu sec est repris par 7 ml d'un mélange 60% eau et 40% acétonitrile et injecté en deux fois sur une colonne semi-préparative Nucléosil 7μ C8 10x250 mm (Macherey Nagel) éluee dans un mélange de 68% de tampon phosphate 100 mM pH 2,9 et 32% d'acétonitrile. Les fractions contenant la 4ζ-diéthylamino-dés (4ζ-diméthylamino) pristinamycine I_A sont regroupées et extraites

par un volume de dichlorométhane. La phase organique est lavée à l'eau, séchée sur sulfate de sodium puis évaporée. On obtient 50 mg de 4ζ -diéthylamino-dés (4ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A.

Spectre de R.M.N. 1 H (400 MHz, CDCl₃, δ en ppm, ref. TMS): 0,65 (dd, J = 5 16 et 6 Hz, 1H : 1H du CH₂ en 5 β) ; 0,90 (t, J = 7,5 Hz, 3H : CH₃ en 2 γ) ; 1,14 (t, J = 7 Hz, 6H : CH₂ de l'éthyle) ; 1,15 (mt, 1H : 1H du CH₂ en 3 β) ; 1,26 (mt, 1H : 1H du CH₂ en 3 γ) ; 1,32 (d, J = 6,5 Hz, 3H : CH₃ en 1 γ) ; 1,55 (mt, 1H : l'autre H du CH₂ en 3 γ) ; 1,63 et 1,75 (2 mts, 1H chacun : CH₂ en 2 β) ; 2,02 (mt, 1H : l'autre H du CH₂ en 3 β) ; 2,22 et 2,31 (respectivement mt et d large, J = 16,5 Hz, 1H chacun : 10 CH₂ en 5 δ) ; 2,37 (d, J = 16 Hz, 1H : l'autre H du CH₂ en 5 β) ; 2,80 (dt, J = 13 et 4,5 Hz, 1H : 1H du CH₂ en 5 ϵ) ; 2,89 (dd, J = 12,5 et 4 Hz, 1H : 1H du CH₂ en 4 β) ; de 3,20 à 3,40 (mt, 6H : NCH₂ de l'éthyle - 1H du CH₂ en 3 δ et l'autre H du CH₂ en 4 β) ; 3,27 (s, 3H : NCH₃) ; 3,55 (mt, 1H : l'autre H du CH₂ en 3 δ) ; 4,58 (dd, J = 8 et 6 Hz, 1H : 3 α) ; 4,76 (dd large, J = 13 et 7,5 Hz, 1H : l'autre H du CH₂ en 5 ϵ) ; 4,84 15 (mt, 1H : 2 α) ; 4,89 (dd, J = 10 et 1 Hz, 1H : 1 α) ; 5,21 (dd, J = 12,5 et 4 Hz, 1H : 4 α) ; 5,28 (d large, J = 6 Hz, 1H : 5 α) ; 5,87 (d, J = 9,5 Hz, 1H : 6 α) ; 5,90 (mt, 1H : 1 β) ; 6,52 (d, J = 9,5 Hz, 1H : NH en 2) ; 6,60 (d, J = 8 Hz, 2H : H Aromatiques en 4 ϵ) ; 7,02 (d, J = 8 Hz, 2H : H Aromatiques en 4 δ) ; de 7,10 à 7,35 (mt, 5H : H Aromatiques en 6) ; 7,46 (AB limite, 2H : 1' H₄ et 1' H₅) ; 7,88 (dd, J = 4,5 et 2,5 Hz, 20 1H : 1' H₆) ; 8,43 (d, J = 10 Hz, 1H : NH en 1) ; 8,76 (d, J = 9,5 Hz, 1H : NH en 6) ; 11,62 (s, 1H : OH).

EXEMPLE 20 : Préparation de la 4ζ -diallylamino-dés(4ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A

On réalise à l'échelle de 94 erlenmeyers comme décrit dans l'exemple 3 une culture de la souche SP92::pVRC508 en milieu de production avec ajout à 16h de 1 ml d'une solution à 20 g/l dans l'eau de dichlorhydrate de 4-diallylaminophénylalanine (R,S) 30 synthétisé comme à l'exemple 38-1 . Au terme de 40 h de culture, les 2,8 litres de moût issus de 94 erlenmeyers sont extraits par 2 volumes d'un mélange de 66% de tampon phosphate 100 mM pH 2,9 et 34% d'acetonitrile, puis centrifugés. Le surnageant est extrait par 2 fois 0,5 volumes de dichlorométhane. Les phases chlorométhyléniques sont lavées à l'eau puis combinées, séchées sur sulfate de sodium et évaporées. L'extrait sec est repris par 20 ml de dichlorométhane et injecté sur une 35 colonne.

colonne de silice (30g) montée dans le dichlorométhane et éluée successivement par paliers de 0 à 10 % de méthanol dans le dichlorométhane. Les fractions contenant la 4ζ -diallylamino-dés (4ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A sont regroupées et évaporées. Le résidu sec est repris par 7 ml d'un mélange 60% eau et 40% acetonitrile 5 et injecté sur une colonne semi-préparative Nucléosil 7μ C8 10x250 mm (Macherey Nagel) éluée dans un mélange de 52% de tampon phosphate 100 mM pH 2,9 et 48% d'acetonitrile. Les fractions contenant la 4ζ -diallylamino-dés (4ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A sont regroupées et extraites par un volume de dichlorométhane. La phase organique est lavée à l'eau, séchée sur sulfate de sodium puis évaporée. On 10 obtient 15 mg de 4ζ -diallylamino-dés (4ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A.

Spectre de R.M.N. 1 H (400 MHz, CDCl₃, δ en ppm, ref. TMS): 0,55 (dd, J = 16 et 6 Hz, 1H : 1H du CH₂ en 5 β) ; 0,93 (t, J = 7,5 Hz, 3H : CH₃ en 2 γ) ; 1,18 (mt, 1H : 1H du CH₂ en 3 β) ; 1,25 (mt, 1H : 1H du CH₂ en 3 γ) ; 1,34 (d, J = 6,5 15 Hz, 3H : CH₃ en 1 γ) ; 1,59 (mt, 1H : l'autre H du CH₂ en 3 γ) ; 1,68 et 1,78 (2 mts, 1H chacun : CH₂ en 2 β) ; 2,04 (mt, 1H : l'autre H du CH₂ en 3 β) ; 2,25 et 2,34 (respectivement mt et d large, J = 16,5 Hz, 1H chacun : CH₂ en 5 δ) ; 2,40 (d, J = 16 Hz, 1H : l'autre H du CH₂ en 5 β) ; 2,83 (dt, J = 13 et 4,5 Hz, 1H : 1H du CH₂ en 5 ε) ; 2,92 (dd, J = 12 et 4 Hz, 1H : 1H du CH₂ en 4 β) ; de 3,20 à 3,30 (mt, 1H : 1H 20 du CH₂ en 3 δ) ; 3,29 (s, 3H : NCH₃) ; 3,33 (t, J = 12 Hz, 1H : l'autre H du CH₂ en 4 β) ; 3,57 (mt, 1H : l'autre H du CH₂ en 3 δ) ; 3,93 (AB limite, 4H : NCH₂ de l'allyle) ; 4,60 (dd, J = 8 et 6,5Hz, 1H : 3 α) ; 4,78 (dd large, J = 13 et 7,5 Hz, 1H : l'autre H du CH₂ en 5 ε) ; 4,87 (mt, 1H : 2 α) ; 4,92 (dd, J = 10 et 1 Hz, 1H : 1 α) ; 25 de 5,10 à 5,25 (mt, 5H : 4 α et =CH₂ de l'allyle) ; 5,28 (d large, J = 6 Hz, 1H : 5 α) ; 5,85 (mt, 2H : CH= de l'allyle) ; 5,92 (d, J = 9,5 Hz, 1H : 6 α) ; 5,94 (mt, 1H : 1 β) ; 6,54 (d, J = 10 Hz, 1H : NH en 2) ; 6,65 (d, J = 8 Hz, 2H : H Aromatiques en 4 ε) ; 7,05 (d, J = 8 Hz, 2H : H Aromatiques en 4 δ) ; de 7,10 à 7,35 (mt, 5H : H Aromatiques en 6) ; 7,51 (AB limite, 2H : 1' H₄ et 1' H₅) ; 7,88 (dd, J = 4 et 2 Hz, 1H : 1' H₆) ; 8,43 (d, J = 10 Hz, 1H : NH en 1) ; 8,77 (d, J = 9,5 Hz, 1H : NH en 6) ; 30 11,65 (s, 1H : OH).

EXAMPLE 21 : Préparation de la 4ζ -allylénethylamino-dés (4ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A

On réalise à l'échelle de 26 erlenmeyers comme décrit dans l'exemple 3 une culture de la souche SP92::pVRC508 en milieu de production avec ajout à 16h de 1 ml d'une solution à 20 g/l dans la soude 0,1N de dichlorhydrate de 4-allyléthylaminophénylalanine (R,S) synthétisée comme à l'exemple 39-4. Au terme 5 de 40 h de culture, les 0,78 litre de moût issus de 26 erlenmeyers sont extraits par 2 volumes d'un mélange de 66% de tampon phosphate 100 mM pH 2,9 et 34% d'acétonitrile, puis centrifugés. Le surnageant est extrait par 2 fois 0,5 volumes de dichlorométhane. Les phases chlorométhyléniques sont lavées à l'eau puis combinées, 10 séchées sur sulfate de sodium et évaporées. L'extrait sec est repris par 20 ml de dichlorométhane et injecté sur une colonne de silice (30g) montée dans le dichlorométhane et éluée successivement par paliers de 0 à 10 % de méthanol dans le dichlorométhane. Les fractions contenant la 4 ζ -allyléthylamino-dés (4 ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A sont regroupées et évaporées. Le résidu sec est repris par 7 ml d'un mélange 60% eau et 40% acétonitrile et injecté sur une colonne 15 semi-préparative Nucléosil 7 μ C8 10x250 mm (Macherey Nagel) éluée dans un mélange de 52% de tampon phosphate 100 mM pH 2,9 et 48% d'acétonitrile. Les fractions contenant la 4 ζ -allyléthylamino-dés(4 ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A sont regroupées et extraites par un volume de dichlorométhane. La phase organique 20 est lavée à l'eau, séchée sur sulfate de sodium puis évaporée. On obtient 20 mg de 4 ζ -allyléthylamino-dés (4 ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A.

Spectre de R.M.N. ¹ H (400 MHz, CDCl₃, δ en ppm, ref. TMS): 0,58 (dd, J = 16 et 6 Hz, 1H : 1H du CH₂ en 5 β) ; 0,91 (t, J = 7,5 Hz, 3H : CH₃ en 2 γ) ; 1,16 (t, J = 7 Hz, 3H : CH₃ de l'éthyle) ; 1,16 (mt, 1H : 1H du CH₂ en 3 β) ; 1,25 (mt, 1H : 1H du CH₂ en 3 γ) ; 1,32 (d, J = 6,5 Hz, 3H : CH₃ en 1 γ) ; 1,54 (mt, 1H : l'autre H du CH₂ en 3 γ) ; 1,63 et 1,75 (2 mts, 1H chacun : CH₂ en 2 β) ; 2,02 (mt, 1H : l'autre H du CH₂ en 3 β) ; 2,23 et 2,31 (respectivement mt et d large, J = 16,5 Hz, 1H chacun : CH₂ en 5 δ) ; 2,37 (d, J = 16 Hz, 1H : l'autre H du CH₂ en 5 β) ; 2,80 (dt, J = 13 et 4,5 Hz, 1H : 1H du CH₂ en 5 ϵ) ; 2,87 (dd, J = 12 et 4 Hz, 1H : 1H du CH₂ en 4 β) ; de 3,15 à 3,30 (mt, 1H : 1H du CH₂ en 3 δ) ; 3,26 (s, 3H : NCH₃) ; 3,30 (t, J = 12 Hz, 1H : l'autre H du CH₂ en 4 β) ; 3,36 (mt, 2H : NCH₂ de l'éthyle) ; 3,54 (mt, 1H : l'autre H du CH₂ en 3 δ) ; 3,90 (AB limite, 2H : NCH₂ de l'allyle) ; 4,57 (dd, J = 8 et 6 Hz, 1H : 3 α) ; 4,76 (dd large, J = 13 et 7,5 Hz, 1H : l'autre H du CH₂ en 5 ϵ) ; 4,84 (mt, 1H : 2 α) ; 4,89 (dd, J = 10 et 1 Hz, 1H : 1 α) ; de 5,05 à 5,20 (mt, 3H : 4 α et =CH₂ de l'allyle) ; 5,27 (d large, J = 6 Hz, 1H : 5 α) ; 5,83 (mt, 1H : CH= de l'allyle) ; 5,88 (d, J = 9,5 Hz, 1H : 6 α) ; 5,91 (mt, 1H : 1 β) ; 6,50 (d, J = 10 Hz, 1H : NH en 2) ; 6,60 (d,

J = 8 Hz, 2H : H Aromatiques en 4 ε) ; 7,02 (d, J = 8 Hz, 2H : H Aromatiques en 4 δ) ; de 7,10 à 7,35 (mt, 5H : H Aromatiques en 6) ; 7,47 (AB limite, 2H : 1' H₄ et 1' H₅) ; 7,88 (dd, J = 4 et 2 Hz, 1H : 1' H₆) ; 8,41 (d, J = 10 Hz, 1H : NH en 1) ; 8,75 (d, J = 9,5 Hz, 1H : NH en 6) ; 11,62 (s, 1H : OH).

5

EXEMPLE 22 : Préparation de la 4 ζ -éthyl propylamino-dés(4 ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A

10 On réalise à l'échelle de 60 erlenmeyers comme décrit dans l'exemple 3 une culture de la souche SP92::pVRC508 en milieu de production avec ajout à 16h de 1 ml d'une solution à 20 g/l dans la soude 0,1N de dichlorhydrate de 4 éthylpropylaminophénylalanine (R,S) synthétisée comme à l'exemple 39-6. Au terme de 40 h de culture, les 1,8 litres de moût issus de 60 erlenmeyers sont extraits par 2 volumes d'un mélange de 66% de tampon phosphate 100 mM pH 2,9 et 34% d'acetonitrile, puis centrifugés. Le surnageant est extrait par 2 fois 0,5 volumes de dichlorométhane. Les phases chlorométhyléniques sont lavées à l'eau puis combinées, séchées sur sulfate de sodium et évaporées. L'extrait sec est repris par 20 ml de dichlorométhane et injecté sur une colonne de silice (30g) montée dans le dichlorométhane et éluée successivement par paliers de 0 à 10 % de méthanol dans le dichlorométhane. Les fractions contenant la 4 ζ -éthyl propylamino-dés (4 ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A sont regroupées et évaporées. Le résidu sec est repris par 7 ml d'un mélange 60% eau et 40% acetonitrile et injecté sur une colonne semi-préparative Nucléosil 7 μ C8 10x250 mm (Macherey Nagel) éluée dans un mélange de 63% de tampon phosphate 100 mM pH 2,9 et 37% d'acetonitrile. Les fractions contenant la 4 ζ -éthyl propylamino-dés (4 ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A sont regroupées et extraites par un volume de dichlorométhane. La phase organique est lavée à l'eau, séchée sur sulfate de sodium puis évaporée. On obtient 16 mg de 4 ζ -éthyl propylamino-dés (4 ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A.

30 Spectre de R.M.N. ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ en ppm, ref. TMS) : 0,67 (dd, J = 16 et 6 Hz, 1H : 1H du CH₂ en 5 β) ; 0,91 (t, J = 7,5 Hz, 3H : CH₃ en 2 γ) ; 0,95 (t, J = 7,5 Hz, 3H : CH₃ du propyle) ; 1,14 (t, J = 7 Hz, 3H : CH₃ de l'éthyle) ; 1,15 (mt, 1H : 1H du CH₂ en 3 β) ; 1,25 (mt, 1H : 1H du CH₂ en 3 γ) ; 1,33 (d, J = 7 Hz, 3H : CH₃ en 1 γ) ; de 1,45 à 1,65 (mt, 3H : l'autre H du CH₂ en 3 γ et CH₂ propyle) ; 1,63 et 1,75 (2 mts, 1H chacun : CH₂ en 2 β) ; 2,02 (mt, 1H : l'autre H du CH₂ en 3 β) ;

2,23 et 2,33 (respectivement mt et d large, J = 16,5 Hz, 1H chacun : CH₂ en 5 δ) ; 2,37 (d, J = 16 Hz, 1H : l'autre H du CH₂ en 5 β) ; 2,80 (dt, J = 13 et 5 Hz, 1H : 1H du CH₂ en 5 ε) ; 2,89 (dd, J = 12 et 4 Hz, 1H : 1H du CH₂ en 4 β) ; de 3,10 à 3,25 (mt, 3H : 1H du CH₂ en 3 δ et NCH₂ du propyle) ; 3,26 (s, 3H : NCH₃) ; de 3,25 à 5 3,40 (mt, 2H : NCH₂ de l'éthyle) ; 3,34 (t, J = 12 Hz, 1H : l'autre H du CH₂ en 4 β) ; 3,54 (mt, 1H : l'autre H du CH₂ en 3 δ) ; 4,57 (dd, J = 7,5 et 6 Hz, 1H : 3 α) ; 4,76 (dd large, J = 13 et 7,5 Hz, 1H : l'autre H du CH₂ en 5 ε) ; 4,84 (mt, 1H : 2 α) ; 4,89 (dd, J = 10 et 1 Hz, 1H : 1 α) ; 5,21 (dd, J = 12 et 4 Hz, 1H : 4 α) ; 5,28 (d large, J = 6 Hz, 1H : 5 α) ; 5,88 (d, J = 9,5 Hz, 1H : 6 α) ; 5,91 (mt, 1H : 1 β) ; 6,48 (d, J = 10 Hz, 1H : NH en 2) ; 6,60 (d, J = 8 Hz, 2H : H Aromatiques en 4 ε) ; 7,03 (d, J = 8 Hz, 10 2H : H Aromatiques en 4 δ) ; de 7,10 à 7,35 (mt, 5H : H Aromatiques en 6) ; 7,47 (AB limite, 2H : 1' H₄ et 1' H₅) ; 7,89 (mt, 1H : 1' H₄) ; 8,42 (d, J = 10 Hz, 1H : NH en 1) ; 8,76 (d, J = 9,5 Hz, 1H : NH en 6) ; 11,62 (s, 1H : OH).

15

EXEMPLE 23 : Préparation de la 4ζ-trifluorométhoxy-dés(4ζ-diméthylamino) pristinamycine I_A

On réalise à l'échelle de 60 erlenmeyers comme décrit dans l'exemple 3 une 20 culture de la souche SP92::pVRC508 en milieu de production avec ajout à 16h de 1 ml d'une solution à 20 g/l dans l'eau de chlorhydrate de 4-O-trifluorométhyltyrosine (R,S) synthétisé comme à l'exemple 34-8. Au terme de 40 h de culture, les 1,8 litres de moût issus de 60 erlenmeyers sont extraits par 2 volumes d'un mélange de 66% de tampon phosphate 100 mM pH 2,9 et 34% d'acetonitrile, puis centrifugés. Le 25 surnageant est extrait par 2 fois volumes de dichlorométhane. Les phases chlorométhyléniques sont lavées à l'eau puis combinées, séchées sur sulfate de sodium et évaporées. L'extrait sec est repris par ml de dichlorométhane et injecté sur une colonne de silice (30g) montée dans le dichlorométhane et éluée successivement par paliers de 0 à 10 % de méthanol dans le dichlorométhane. Les fractions contenant 30 la 4ζ-trifluorométhoxy-dés (4ζ-diméthylamino) pristinamycine I_A sont regroupées et évaporées. Le résidu sec est repris par 7 ml d'un mélange 60% eau et 40% acetonitrile et injecté en deux fois sur une colonne semi-préparative Nucléosil 7μ C8 10x250 mm (Macherey Nagel) éluée dans un mélange de 60% de tampon phosphate 100 mM pH 2,9 et 40% d'acetonitrile. Les fractions contenant la 4ζ-trifluorométhoxy-dés (4ζ- 35 diméthylamino) pristinamycine I_A sont regroupées et extraites par un volume de

dichlorométhane. La phase organique est lavée à l'eau, séchée sur sulfate de sodium puis évaporée. On obtient 46,5 mg de 4ζ -trifluorométhoxy-dés (4ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A.

Spectre de R.M.N. ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ en ppm, ref. TMS): 0,77 (dd, J = 16 et 5,5 Hz, 1H : 1H du CH₂ en 5 β) ; 0,92 (t, J = 7,5 Hz, 3H : CH₃ en 2 γ) ; 1,08 (mt, 1H : 1H du CH₂ en 3 β) ; de 1,30 à 1,40 (mt, 1H : 1H du CH₂ en 3 γ) ; 1,33 (d, J = 7 Hz, 3H : CH₃ en 1 γ) ; de 1,55 à 1,70 (mt, 1H : l'autre H du CH₂ en 3 γ) ; 1,65 et 1,76 (2 mts, 1H chacun : CH₂ en 2 β) ; 2,02 (mt, 1H : l'autre H du CH₂ en 3 β) ; 2,11 et 2,40 (respectivement mt et d large, J = 16,5 Hz, 1H chacun : CH₂ en 5 δ) ; 2,54 (d, J = 16 Hz, 1H : l'autre H du CH₂ en 5 β) ; 2,88 (dt, J = 13 et 4 Hz, 1H : 1H du CH₂ en 5 ε) ; 3,08 (dd, J = 12 et 5 Hz, 1H : 1H du CH₂ en 4 β) ; 3,22 (s, 3H : NCH₃) ; de 3,30 à 3,45 (mt, 1H : 1H du CH₂ en 3 δ) ; 3,39 (t, J = 12 Hz, 1H : l'autre H du CH₂ en 4 β) ; 3,59 (mt, 1H : l'autre H du CH₂ en 3 δ) ; 4,53 (t, J = 7,5 Hz, 1H : 3 α) ; 4,75 (dd large, J = 13 et 8 Hz, 1H : l'autre H du CH₂ en 5 ε) ; 4,85 (mt, 1H : 2 α) ; 4,89 (dd, J = 10 et 1,5 Hz, 1H : 1 α) ; 5,35 (d large, J = 5,5 Hz, 1H : 5 α) ; 5,41 (dd, J = 12 et 5 Hz, 1H : 4 α) ; 5,92 (d, J = 10 Hz, 1H : 6 α) ; 5,93 (mt, 1H : 1 β) ; 6,53 (d, J = 9,5 Hz, 1H : NH en 2) ; de 7,15 à 7,35 (mt, 5H : H Aromatiques en 6) ; 7,16 (d, J = 8 Hz, 2H : H Aromatiques en 4 ε) ; 7,26 (d, J = 8 Hz, 2H : H Aromatiques en 4 δ) ; 7,37 (dd, J = 8,5 et 4 Hz, 1H : 1' H_s) ; 7,42 (dd, J = 8,5 et 1,5 Hz, 1H : 1' H₄) ; 7,70 (dd, J = 4 et 1,5 Hz, 1H : 1' H₃) ; 8,37 (d, J = 10 Hz, 1H : NH en 1) ; 8,75 (d, J = 10 Hz, 1H : NH en 6) ; 11,66 (s, 1H : OH).

EXEMPLE 24 : Préparation de la 4ζ -allyloxy-dés (4ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A

On réalise à l'échelle de 90 erlenmeyers comme décrit dans l'exemple 3 une culture de la souche SP92::pVRC508 en milieu de production avec ajout à 16h de 1 ml d'une solution à 20 g/l dans l'acide chlorhydrique 0,1N de chlorhydrate de 4-O-allyltyrosine (S) synthétisée comme à l'exemple 33. Au terme de 40 h de culture, les 2,7 litres de moût issus de 90 erlenmeyers sont extraits par 2 volumes d'un mélange de 66% de tampon phosphate 100 mM pH 2,9 et 34% d'acetonitrile, puis centrifugés. Le surnageant est extrait par 2 fois 0,5 volumes de dichlorométhane. Les phases chlorométhyléniques sont lavées à l'eau puis combinées, séchées sur sulfate de sodium et évaporées. L'extrait sec est repris par 20 ml de dichlorométhane et injecté

sur une colonne de silice (30g) montée dans le dichlorométhane et éluée successivement par paliers de 0 à 10 % de méthanol dans le dichlorométhane. Les fractions contenant la 4ζ -allyloxy-dés (4ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A sont regroupées et évaporées. Le résidu sec est repris par 7 ml d'un mélange 60% eau et 5 40% acétonitrile et injecté sur une colonne semi-préparative Nucléosil 7 μ C8 10x250 mm (Macherey Nagel) éluée dans un mélange de 52% de tampon phosphate 100 mM pH 2,9 et 48% d'acétonitrile. Les fractions contenant la 4ζ -allyloxy-dés (4ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A sont regroupées et extraites par un volume de dichlorométhane. La phase organique est lavée à l'eau, séchée sur sulfate de sodium puis évaporée. On obtient 29 mg de 4ζ -allyloxy-dés (4ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A.

Spectre de R.M.N. ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ en ppm, ref. TMS): 0,63 (dd, J = 16 et 6 Hz, 1H : 1H du CH₂ en 5 β) ; 0,91 (t, J = 7,5 Hz, 3H : CH₃ en 2 γ) ; 1,13 (mt, 1H : 1H du CH₂ en 3 β) ; 1,29 (mt, 1H : 1H du CH₂ en 3 γ) ; 1,33 (d, J = 6,5 Hz, 3H : 10 CH₃ en 1 γ) ; 1,57 (mt, 1H : l'autre H du CH₂ en 3 γ) ; 1,65 et 1,74 (2 mts, 1H chacun : CH₂ en 2 β) ; 2,02 (mt, 1H : l'autre H du CH₂ en 3 β) ; 2,14 et 2,34 (respectivement 15 mt et d large, J = 16,5 Hz, 1H chacun : CH₂ en 5 δ) ; 2,43 (d, J = 16 Hz, 1H : l'autre H du CH₂ en 5 β) ; 2,85 (dt, J = 13 et 4 Hz, 1H : 1H du CH₂ en 5 ϵ) ; 2,95 (dd, J = 12 et 4 Hz, 1H : 1H du CH₂ en 4 β) ; 3,25 (s, 3H : NCH₃) ; 3,33 (mt, 1H : 1H du CH₂ en 3 20 δ) ; 3,36 (t, J = 12 Hz, 1H : l'autre H du CH₂ en 4 β) ; 3,56 (mt, 1H : l'autre H du CH₂ en 3 δ) ; 4,51 (AB limite, 2H : OCH₂ de l'allyle) ; 4,56 (t, J = 7,5 Hz, 1H : 3 α) ; 4,75 (dd large, J = 13 et 8 Hz, 1H : l'autre H du CH₂ en 5 ϵ) ; 4,84 (mt, 1H : 2 α) ; 4,88 (dd, J = 10 et 1 Hz, 1H : 1 α) ; 5,27 (dd, J = 12 et 4 Hz, 1H : 4 α) ; 5,32 (d large, J = 6 Hz, 1H : 5 α) ; 5,30 et 5,40 (respectivement mt et dd, J = 17 et 1,5 Hz, 1H chacun : 25 =CH₂ de l'allyle) ; 5,89 (d, J = 9,5 Hz, 1H : 6 α) ; 5,91 (mt, 1H : 1 β) ; 6,02 (mt, 1H : CH= de l'allyle) ; 6,50 (d, J = 10 Hz, 1H : NH en 2) ; 6,85 (d, J = 8 Hz, 2H : H Aromatiques en 4 ϵ) ; 7,12 (d, J = 8 Hz, 2H : H Aromatiques en 4 δ) ; de 7,10 à 7,35 (mt, 5H : H Aromatiques en 6) ; 7,45 (dd, J = 8,5 et 1,5 Hz, 1H : 1' H_d) ; 7,57 (dd, J = 8,5 et 4 Hz, 1H : 1' H_d) ; 7,77 (dd, J = 4 et 1,5 Hz, 1H : 1' H_d) ; 8,41 (d, J = 10 Hz, 1H 30 : NH en 1) ; 8,74 (d, J = 9,5 Hz, 1H : NH en 6) ; 11,63 (s, 1H : OH).

EXAMPLE 25 : Préparation de la 4ζ -éthoxy-dés(4ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A

On réalise à l'échelle de 90 erlenmeyers comme décrit dans l'exemple 3 une culture de la souche SP92::pVRC508 en milieu de production avec ajout à 16h de 1 ml d'une solution à 20 g/l dans l'acide chlorhydrique 0,1N de chlorhydrate de 4-O-éthyltyrosine (S) synthétisé comme à l'exemple 33. Au terme de 40 h de culture, les 5 2,7 litres de moût issus de 90 erlenmeyers sont extraits par 2 volumes d'un mélange de 66% de tampon phosphate 100 mM pH 2,9 et 34% d'acetonitrile, puis centrifugés. Le surnageant est extrait par 2 fois 0,5 volumes de dichlorométhane. Les phases chlorométhyléniques sont lavées à l'eau puis combinées, séchées sur sulfate de sodium et évaporées. L'extrait sec est repris par 20 ml de dichlorométhane et injecté 10 sur une colonne de silice (30g) montée dans le dichlorométhane et éluée successivement par paliers de 0 à 10 % de méthanol dans le dichlorométhane. Les fractions contenant la 4ζ -éthoxy-dés (4ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A sont regroupées et évaporées. Le résidu sec est repris par 7 ml d'un mélange 60% eau et 40% acetonitrile et injecté sur une colonne semi-préparative Nucléosil 7 μ C8 10x250 15 mm (Macherey Nagel) éluée dans un mélange de 52% de tampon phosphate 100 mM pH 2,9 et 48% d'acetonitrile. Les fractions contenant la 4ζ -éthoxy-dés (4ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A sont regroupées et extraites par un volume de dichlorométhane. La phase organique est lavée à l'eau, séchée sur sulfate de sodium puis évaporée. On obtient 29 mg de 4ζ -éthoxy-dés (4ζ -diméthylamino) 20 pristinamycine I_A.

Spectre de R.M.N. ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ en ppm, ref. TMS): 0,64 (dd, J = 16 et 5,5 Hz, 1H : 1H du CH₂ en 5 β) ; 0,90 (t, J = 7,5 Hz, 3H : CH₃ en 2 γ) ; 1,12 (mt, 1H : 1H du CH₂ en 3 β) ; 1,25 (mt, 1H : 1H du CH₂ en 3 γ) ; 1,33 (d, J = 7 Hz, 3H : CH₃ en 1 γ) ; 1,42 (t, J = 7 Hz, 3H : CH₃ de l'éthyle) ; 1,57 (mt, 1H : l'autre H du 25 CH₂ en 3 γ) ; 1,63 et 1,74 (2 mts, 1H chacun : CH₂ en 2 β) ; 2,02 (mt, 1H : l'autre H du CH₂ en 3 β) ; 2,16 et 2,35 (respectivement mt et d large, J = 16,5 Hz, 1H chacun : CH₂ en 5 δ) ; 2,43 (d, J = 16 Hz, 1H : l'autre H du CH₂ en 5 β) ; 2,83 (dt, J = 13 et 4 Hz, 1H : 1H du CH₂ en 5 ϵ) ; 2,93 (dd, J = 12 et 4 Hz, 1H : 1H du CH₂ en 4 β) ; de 3,15 à 3,30 (mt, 1H : 1H du CH₂ en 3 δ) ; 3,24 (s, 3H : NCH₃) ; 3,35 (t, J = 12 Hz, 1H 30 : l'autre H du CH₂ en 4 β) ; 3,55 (mt, 1H : l'autre H du CH₂ en 3 δ) ; 3,95 (AB limite, 2H : OCH₂ de l'éthyle) ; 4,56 (dd, J = 7,5 et 6 Hz, 1H : 3 α) ; 4,75 (dd large, J = 13 et 8 Hz, 1H : l'autre H du CH₂ en 5 ϵ) ; 4,84 (mt, 1H : 2 α) ; 4,87 (dd, J = 10 et 1 Hz, 1H : 1 α) ; 5,26 (dd, J = 12 et 4 Hz, 1H : 4 α) ; 5,32 (d large, J = 5,5 Hz, 1H : 5 α) ; 5,88 (d, J = 10 Hz, 1H : 6 α) ; 5,92 (mt, 1H : 1 β) ; 6,48 (d, J = 10 Hz, 1H : NH en 2 35) ; 6,83 (d, J = 8 Hz, 2H : H Aromatiques en 4 ϵ) ; 7,10 (d, J = 8 Hz, 2H : H

Aromatiques en 4 δ) ; de 7,10 à 7,35 (mt, 5H : H Aromatiques en 6) ; 7,44 (dd, J = 8,5 et 1,5 Hz, 1H : 1' H_a) ; 7,57 (dd, J = 8,5 et 4,5 Hz, 1H : 1' H_b) ; 7,77 (dd, J = 4,5 et 1,5 Hz, 1H : 1' H_c) ; 8,38 (d, J = 10 Hz, 1H : NH en 1) ; 8,75 (d, J = 10 Hz, 1H : NH en 6) ; 11,60 (s, 1H : OH).

5

EXEMPLE 26 : Préparation de la 4 ζ -(2-chloroéthoxy)-dés (4 ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A

On réalise à l'échelle de 60 erlenmeyers comme décrit dans l'exemple 3 une culture de la souche SP92::pVRC508 en milieu de production avec ajout à 16h de 1 ml d'une solution à 20 g/l dans l'eau de chlorydrate de 4-O(2-chloroéthyl) tyrosine (S) synthétisé comme à l'exemple 42-1. Au terme de 40 h de culture, les 1,8 litres de moût issus de 60 erlenmeyers sont extraits par 2 volumes d'un mélange de 66% de tampon phosphate 100 mM pH 2,9 et 34% d'acetonitrile, puis centrifugés. Le surnageant est extrait par 2 fois 0,5 volumes de dichlorométhane. Les phases chlorométhyléniques sont lavées à l'eau puis combinées, séchées sur sulfate de sodium et évaporées. L'extrait sec est repris par 20 ml de dichlorométhane et injecté sur une colonne de silice (30g) montée dans le dichlorométhane et éluée successivement par paliers de 0 à 10 % de méthanol dans le dichlorométhane. Les fractions contenant la 4 ζ -(2-chloroéthoxy)-dés (4 ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A sont regroupées et évaporées. Le résidu sec est repris par 7 ml d'un mélange 60% eau et 40% acetonitrile et injecté sur une colonne semi-préparative Nucléosil 7 μ C8 10x250 mm (Macherey Nagel) éluée dans un mélange de 60% de tampon phosphate 100 mM pH 2,9 et 40% d'acetonitrile. Les fractions contenant la 4 ζ -(2-chloroéthoxy)-dés (4 ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A sont regroupées et extraites par un volume de dichlorométhane. La phase organique est lavée à l'eau, séchée sur sulfate de sodium puis évaporée. On obtient 3,2 mg de 4 ζ -(2-chloroéthoxy)-dés (4 ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A.

Spectre de R.M.N. ¹ H (400 MHz, CDCl₃, δ en ppm, ref. TMS): 0,66 (dd, J = 16 et 5,5 Hz, 1H : 1H du CH₂ en 5 β) ; 0,91 (t, J = 7,5 Hz, 3H : CH₃ en 2 γ) ; 1,13 (mt, 1H : 1H du CH₂ en 3 β) ; 1,28 (mt, 1H : 1H du CH₂ en 3 γ) ; 1,33 (d, J = 7 Hz, 3H : CH₃ en 1 γ) ; 1,57 (mt, 1H : l'autre H du CH₂ en 3 γ) ; 1,66 et 1,76 (2 mts, 1H chacun : CH₂ en 2 β) ; 2,02 (mt, 1H : l'autre H du CH₂ en 3 β) ; 2,16 et 2,37 (respectivement mt et d large, J = 16,5 Hz, 1H chacun : CH₂ en 5 δ) ; 2,47 (d, J = 16

Hz, 1H : l'autre H du CH₂ en 5 β) ; 2,86 (dt, J = 13 et 4 Hz, 1H : 1H du CH₂ en 5 ε) ; 2,95 (dd, J = 12 et 4 Hz, 1H : 1H du CH₂ en 4 β) ; 3,23 (s, 3H : NCH₃) ; 3,32 (mt, 1H : 1H du CH₂ en 3 δ) ; 3,37 (t, J = 12 Hz, 1H : l'autre H du CH₂ en 4 β) ; 3,57 (mt, 1H : l'autre H du CH₂ en 3 δ) ; 3,82 (t, J = 6 Hz, 2H : CH₂Cl) ; 4,19 (AB limite, 2H : OCH₂ de l'éthyle) ; 4,55 (dd, J = 7,5 et 7 Hz, 1H : 3 α) ; 4,75 (dd large, J = 13 et 8 Hz, 1H : l'autre H du CH₂ en 5 ε) ; 4,84 (mt, 1H : 2 α) ; 4,87 (d large, J = 10 Hz, 1H : 1 α) ; 5,28 (dd, J = 12 et 4 Hz, 1H : 4 α) ; 5,32 (d large, J = 5,5 Hz, 1H : 5 α) ; 5,88 (d, J = 10 Hz, 1H : 6 α) ; 5,90 (mt, 1H : 1 β) ; 6,50 (d, J = 10 Hz, 1H : NH en 2) ; 6,86 (d, J = 8 Hz, 2H : H Aromatiques en 4 ε) ; 7,13 (d, J = 8 Hz, 2H : H Aromatiques en 4 δ) ; de 7,10 à 7,35 (mt, 5H : H Aromatiques en 6) ; 7,45 (AB limite, 2H : 1' H₄ et 1' H₅) ; 7,75 (dd, J = 4 et 2 Hz, 1H : 1' H₆) ; 8,38 (d, J = 10 Hz, 1H : NH en 1) ; 8,74 (d, J = 10 Hz, 1H : NH en 6) ; 11,62 (s, 1H : OH).

EXEMPLE 27 : Préparation de la 4ζ-acétyl -dés 4ζ-diméthylamino) pristinamycine I_A

On réalise à l'échelle de 60 erlenmeyers comme décrit dans l'exemple 3 une culture de la souche SP92::pVRC508 en milieu de production avec ajout à 16h de 1 ml d'une solution à 20 g/l dans la soude 0,1N de 4-acétyl phénylalanine (S) synthétisée comme à l'exemple 33. Au terme de 40 h de culture, les 1,8 litres de moût issus de 60 erlenmeyers sont extraits par 2 volumes d'un mélange de 66% de tampon phosphate 100 mM pH 2,9 et 34% d'acétonitrile, puis centrifugés. Le surnageant est extrait par 2 fois 0,5 volumes de dichlorométhane. Les phases chlorométhyléniques sont lavées à l'eau puis combinées, séchées sur sulfate de sodium et évaporées. L'extrait sec est repris par 20 ml de dichlorométhane et injecté sur une colonne de silice (30g) montée dans le dichlorométhane et éluée successivement par paliers de 0 à 10 % de méthanol dans le dichlorométhane. Les fractions contenant la 4ζ-acétyl-dés (4ζ-diméthylamino) pristinamycine I_A sont regroupées et évaporées. Le résidu sec est repris par 7 ml d'un mélange 60% eau et 40% acétonitrile et injecté sur une colonne semi-préparative Nucléosil 7μ C8 10x250 mm (Macherey Nagel) éluée dans un mélange de 60% de tampon phosphate 100 mM pH 2,9 et 40% d'acétonitrile. Les fractions contenant la 4ζ-acétyl-dés (4ζ-diméthylamino) pristinamycine I_A sont regroupées et extraites par un volume de dichlorométhane. La phase organique est

lavée à l'eau, séchée sur sulfate de sodium puis évaporée. On obtient 4,2 mg de 4ζ -acétyl-dés (4ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A.

Spectre de R.M.N. ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ en ppm, ref. TMS): 0,73 (dd, J = 16 et 6 Hz, 1H : 1H du CH₂ en 5 β) ; 0,93 (t, J = 7,5 Hz, 3H : CH₃ en 2 γ) ; 1,12 (mt, 5 1H : 1H du CH₂ en 3 β) ; de 1,25 à 1,45 (mt, 1H : 1H du CH₂ en 3 γ) ; 1,33 (d, J = 7 Hz, 3H : CH₃ en 1 γ) ; 1,62 (mt, 1H : l'autre H du CH₂ en 3 γ) ; de 1,60 à 1,85 (mt, 2H : CH₂ en 2 β) ; 2,02 (mt, 1H : l'autre H du CH₂ en 3 β) ; 2,20 et 2,42 (respectivement mt et d large, J = 16,5 Hz, 1H chacun : CH₂ en 5 δ) ; 2,52 (d, J = 16 Hz, 1H : l'autre H du CH₂ en 5 β) ; 2,60 (s, 3H : ArCOCH₃) ; 2,88 (dt, J = 13 et 4,5 Hz, 1H : 1H du CH₂ en 5 ϵ) ; 3,13 (dd, J = 13,5 et 5,5 Hz, 1H : 1H du CH₂ en 4 β) ; 3,21 (s, 3H : NCH₃) ; de 3,30 à 3,50 (mt, 1H : l'autre H du CH₂ en 4 β) ; de 3,30 à 3,50 et 3,63 (2 mts, 1H chacun : CH₂ en 3 δ) ; 4,53 (t, J = 7,5 Hz, 1H : 3 α) ; 4,75 (dd large, J = 13 et 8 Hz, 1H : l'autre H du CH₂ en 5 ϵ) ; 4,84 (mt, 1H : 2 α) ; 4,88 (dd, J = 10 et 1 Hz, 1H : 1 α) ; 5,35 (d large, J = 6 Hz, 1H : 5 α) ; 5,43 (dd, J = 10,5 et 4 Hz, 1H : 4 α) ; 5,90 (d, 15 J = 9,5 Hz, 1H : 6 α) ; 5,92 (mt, 1H : 1 β) ; 6,56 (d, J = 9,5 Hz, 1H : NH en 2) ; de 7,10 à 7,35 (mt, 5H : H Aromatiques en 6) ; 7,28 (d, J = 8 Hz, 2H : H Aromatiques en 4 δ) ; 7,38 (dd, J = 8,5 et 2 Hz, 1H : 1' H₄) ; 7,42 (dd, J = 8,5 et 4,5 Hz, 1H : 1' H₅) ; 7,66 (dd, J = 4,5 et 2 Hz, 1H : 1' H₆) ; 7,88 (d, J = 8 Hz, 2H : H Aromatiques en 4 ϵ) ; 8,38 (d, J = 10 Hz, 1H : NH en 1) ; 8,74 (d, J = 9,5 Hz, 1H : NH en 6) ; 11,65 (s, 1H : 20 OH).

EXEMPLE 28 : Préparation de la 4ζ -diméthylamino-dés (4ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A.

On réalise à l'échelle de 60 erlenmeyers comme décrit dans l'exemple 3 une culture de la souche SP92::pVRC508 en milieu de production avec ajout à 16h de 1 ml d'une solution à 20 g/l dans la soude 0,1N de dichlorhydrate de 3-diméthylaminophénylalanine (R,S) synthétisée comme à l'exemple 35-10. Au terme 25 de 40 h de culture, les 1,8 litres de moût issus de 60 erlenmeyers sont extraits par 2 volumes d'un mélange de 66% de tampon phosphate 100 mM pH 2,9 et 34% d'acétonitrile, puis centrifugés. Le surnageant est extrait par 2 fois 0,5 volumes de dichlorométhane. Les phases chlorométhyléniques sont lavées à l'eau puis combinées, séchées sur sulfate de sodium et évaporées. L'extrait sec est repris par 20 ml de 30 dichlorométhane et injecté sur une colonne de silice (30g) montée dans le 35 dichlorométhane et injecté sur une colonne de silice (30g) montée dans le

dichlorométhane et éluée successivement par paliers de 0 à 10 % de méthanol dans le dichlorométhane. Les fractions contenant la 4ϵ -diméthylamino-dés (4ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A sont regroupées et évaporées. Le résidu sec est repris par 3 ml d'un mélange 60% eau et 40% acetonitrile et injecté sur une colonne semi-préparative Nucléosil 7 μ C8 10x250 mm (Macherey Nagel) éluée dans un mélange de 57% de tampon phosphate 100 mM pH 2,9 et 43% d'acetonitrile. Les fractions contenant la 4ϵ -diméthylamino-dés (4ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A sont regroupées et extraites par un volume de dichlorométhane. La phase organique est lavée à l'eau, séchée sur sulfate de sodium puis évaporée. On obtient 1,1 mg de 4ϵ -diméthylamino-dés (4ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A.

Spectre de R.M.N. ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ en ppm, ref. TMS): 0,63 (dd, J = 16 et 5 Hz, 1H : 1H du CH₂ en 5 β) ; 0,91 (t, J = 7,5 Hz, 3H : CH₃ en 2 γ) ; 1,13 (mt, 1H : 1H du CH₂ en 3 β) ; de 1,20 à 1,35 (mt, 1H : 1H du CH₂ en 3 γ) ; 1,32 (d, J = 6,5 Hz, 3H : CH₃ en 1 γ) ; 1,57 (mt, 1H : l'autre H du CH₂ en 3 γ) ; 1,63 et 1,76 (2 mts, 1H chacun : CH₂ en 2 β) ; 2,02 (mt, 1H : l'autre H du CH₂ en 3 β) ; 2,08 et 2,31 (respectivement mt et d large, J = 16,5 Hz, 1H chacun : CH₂ en 5 δ) ; 2,35 (d, J = 16 Hz, 1H : l'autre H du CH₂ en 5 β) ; 2,81 (dt, J = 13 et 4 Hz, 1H : 1H du CH₂ en 5 ϵ) ; 2,90 (s, 6H : N(CH₃)₂) ; 2,97 (dd, J = 12 et 4 Hz, 1H : 1H du CH₂ en 4 β) ; de 3,20 à 3,30 (mt, 1H : 1H du CH₂ en 3 δ) ; 3,28 (s, 3H : NCH₃) ; 3,37 (t, J = 12 Hz, 1H : l'autre H du CH₂ en 4 β) ; 3,57 (mt, 1H : l'autre H du CH₂ en 3 δ) ; 4,58 (t, J = 7,5 Hz, 1H : 3 α) ; 4,74 (dd large, J = 13 et 8 Hz, 1H : l'autre H du CH₂ en 5 ϵ) ; 4,86 (mt, 1H : 2 α) ; 4,89 (d large, J = 10 Hz, 1H : 1 α) ; 5,27 (dd, J = 12 et 4 Hz, 1H : 4 α) ; 5,29 (d large, J = 5 Hz, 1H : 5 α) ; 5,89 (d, J = 9,5 Hz, 1H : 6 α) ; 5,90 (mt, 1H : 1 β) ; 6,50 (d, J = 10 Hz, 1H : NH en 2) ; de 6,50 à 6,70 (mt, 3H : H Aromatiques en ortho et en para du diméthylamino) ; de 7,15 à 7,35 (mt, 5H : H Aromatiques en 6) ; 7,20 (t, J =

ml d'une solution à 20 g/l dans la soude 0,1N de chlorhydrate de 3-méthylthiophénylalanine (R,S) synthétisé comme à l'exemple 34-11. Au terme de 40 h de culture, les 1,68 litres de moût issus de 56 erlenmeyers sont extraits par 2 volumes d'un mélange de 66% de tampon phosphate 100 mM pH 2,9 et 34% d'acetonitrile, puis centrifugés. Le surnageant est extrait par 2 fois 0,5 volumes de dichlorométhane. Les phases chlorométhyléniques sont lavées à l'eau puis combinées, séchées sur sulfate de sodium et évaporées. L'extrait sec est repris par 20 ml de dichlorométhane et injecté sur une colonne de silice (30g) montée dans le dichlorométhane et éluée successivement par paliers de 0 à 10 % de méthanol dans le dichlorométhane. Les fractions contenant le nouveau dérivé de pristinamycine I_A sont regroupées et évaporées. Le résidu sec est repris par 7 ml d'un mélange 54% eau et 46% acetonitrile et injecté sur une colonne semi-préparative Nucléosil 7μ C8 10x250 mm (Macherey Nagel) éluée dans un mélange de 55% de tampon phosphate 100 mM pH 2,9 et 45% d'acetonitrile. Les fractions contenant la nouvelle pristinamycine sont regroupées et extraites par un volume de dichlorométhane. La phase organique est lavée à l'eau, séchée sur sulfate de sodium puis évaporée. On obtient 20 mg de 4ε-méthylthio-dés (4ζ-diméthylamino) pristinamycine I_A.

Spectre de R.M.N. ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ en ppm, ref. TMS): 0,56 (dd, J = 16 et 5,5 Hz, 1H : 1H du CH₂ en 5 β) ; 0,90 (t, J = 7,5 Hz, 3H : CH₃ en 2 γ) ; 1,13 (mt, 1H : 1H du CH₂ en 3 β) ; 1,28 (mt, 1H : 1H du CH₂ en 3 γ) ; 1,32 (d, J = 6,5 Hz, 3H : CH₃ en 1 γ) ; 1,58 (mt, 1H : l'autre H du CH₂ en 3 γ) ; 1,62 et 1,74 (2 mts, 1H chacun : CH₂ en 2 β) ; 2,02 (mt, 1H : l'autre H du CH₂ en 3 β) ; 2,25 et 2,35 (respectivement mt et d large, J = 16,5 Hz, 1H chacun : CH₂ en 5 δ) ; 2,39 (d, J = 16 Hz, 1H : l'autre H du CH₂ en 5 β) ; 2,43 (s, 3H : SCH₃) ; 2,82 (dt, J = 13 et 4 Hz, 1H : 1H du CH₂ en 5 ε) ; 2,98 (dd, J = 12 et 4,5 Hz, 1H : 1H du CH₂ en 4 β) ; 3,26 (s, 3H : NCH₃) ; 3,30 (t, J = 12 Hz 1H : 1H du CH₂ en 3 δ) ; 3,38 (mt, 1H : l'autre H du CH₂ en 4 β) ; 3,57 (mt, 1H : l'autre H du CH₂ en 3 δ) ; 4,56 (t, J = 7,5 Hz, 1H : 3 α) ; 4,74 (dd large, J = 13 et 8 Hz, 1H : l'autre H du CH₂ en 5 ε) ; 4,84 (mt, 1H : 2 α) ; 4,89 (dd, J = 10 et 1 Hz, 1H : 1 α) ; 5,29 (dd, J = 12 et 4,5 Hz, 1H : 4 α) ; 5,32 (d large, J = 5,5 Hz, 1H : 5 α) ; 5,88 (d, J = 9,5 Hz, 1H : 6 α) ; 5,90 (mt, 1H : 1 β) ; 6,51 (d, J = 10 Hz, 1H : NH en 2) ; 6,99 (d large, J = 8 Hz, 1H : H Aromatique en para du méthylthio) ; 7,10 et 7,15 (respectivement s large et d large, J = 8 Hz, 1H chacun : H Aromatiques en ortho du méthylthio) ; de 7,15 à 7,35 (mt, 6H : H Aromatiques en 6 et H Aromatiques en méta du méthylthio) ; 7,43 (d large, J = 8 Hz, 1H : 1' H_A) ; 7,52

(dd, J = 8 et 4 Hz, 1H : 1' H₅) ; 7,79 (d large, J = 4 Hz, 1H : 1' H₆) ; 8,38 (d, J = 10 Hz, 1H : NH en 1) ; 8,73 (d, J = 9,5 Hz, 1H : NH en 6) ; 11,62 (s, 1H : OH).

EXAMPLE 30 : Préparation de la 4ε-éthoxy-dés(4ζ-diméthylamino) pristinamycine I_A.

5 On réalise à l'échelle de 60 erlenmeyers comme décrit dans l'exemple 3 une culture de la souche SP92::pVRC508 en milieu de production avec ajout à 16h de 1 ml d'une solution à 20 g/l dans la soude 0,2N de chlorhydrate de 3-O-éthyltyrosine (S) synthétisé comme à l'exemple 37-1. Au terme de 40 h de culture, les 1,8 litres de moût issus de 60 erlenmeyers sont extraits par 2 volumes d'un mélange de 66% de tampon phosphate 100 mM pH 2,9 et 34% d'acetonitrile, puis centrifugés. Le surnageant est extrait par 2 fois 0,5 volumes de dichlorométhane. Les phases chlorométhyléniques sont lavées à l'eau puis combinées, séchées sur sulfate de sodium et évaporées. L'extrait sec est repris par 20 ml de dichlorométhane et injecté sur une colonne de silice (30g) montée dans le dichlorométhane et éluée 10 successivement par paliers de 0 à 10 % de méthanol dans le dichlorométhane. Les fractions contenant le nouveau dérivé de pristinamycine I_A sont regroupées et évaporées. On obtient 19 mg de résidu sec. Celui-ci est repris par 3 ml d'un mélange 15 60% eau et 40% acetonitrile et injecté sur une colonne semi-préparative Nucléosil 7μ C8 10x250 mm (Macherey Nagel) éluée dans un mélange de 60% de tampon phosphate 100 mM pH 2,9 et 40% d'acetonitrile. Les fractions contenant la nouvelle pristinamycine sont regroupées et extraites par un volume de dichlorométhane. La phase organique est lavée à l'eau, séchée sur sulfate de sodium puis évaporée. On obtient 15,8 mg de 4ε-O-éthoxy-dés (4ζ-diméthylamino) pristinamycine I_A. 20 25 30 35

Spectre de R.M.N. ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ en ppm, ref. TMS): 0,55 (dd, J = 16 et 5,5 Hz, 1H : 1H du CH₂ en 5 β) ; 0,90 (t, J = 7,5 Hz, 3H : CH₃ en 2 γ) ; 1,12 (mt, 1H : 1H du CH₂ en 3 β) ; 1,20 (mt, 1H : 1H du CH₂ en 3 γ) ; 1,31 (d, J = 6,5 Hz, 3H : CH₃ en 1 γ) ; 1,49 (t, J = 7 Hz, 3H : CH₃ de l'éthyle) ; 1,54 (mt, 1H : l'autre H du CH₂ en 3 γ) ; 1,63 et 1,73 (2 mts, 1H chacun : CH₂ en 2 β) ; 2,02 (mt, 1H : l'autre H du CH₂ en 3 β) ; 2,22 et 2,33 (respectivement mt et d large, J = 16,5 Hz, 1H chacun : CH₂ en 5 δ) ; 2,46 (d, J = 16 Hz, 1H : l'autre H du CH₂ en 5 β) ; 2,83 (dt, J = 13 et 4 Hz, 1H : 1H du CH₂ en 5 ε) ; 2,95 (dd, J = 12 et 4 Hz, 1H : 1H du CH₂ en 4 β) ; 3,22 (mt, 1H : 1H du CH₂ en 3 δ) ; 3,27 (s, 3H : NCH₃) ; 3,39 (t, J = 12 Hz, 1H : l'autre H du CH₂ en 4 β) ; 3,53 (mt, 1H : l'autre H du CH₂ en 3 δ) ; 3,93 et 4,03 (2 mts, 1H chacun : OCH₂ de l'éthyle) ; 4,56 (dd, J = 7 et 5,5 Hz, 1H : 3 α) ; 4,75 (dd large, J = 13 et 8 Hz, 1H : l'autre H du CH₂ en 5 ε) ; 4,82 (mt, 1H : 2 α) ; 4,88 (dd, J = 10 et

1 Hz, 1H : 1 α) ; 5,23 (dd, J = 12 et 4 Hz, 1H : 4 α) ; 5,23 (d large, J = 5,5 Hz, 1H : 5 α) ; 5,87 (d, J = 9,5 Hz, 1H : 6 α) ; 5,92 (mt, 1H : 1 β) ; 6,47 (d, J = 10 Hz, 1H : NH en 2) ; 6,80 (mt, 3H : H Aromatiques en ortho et en para de l'éthoxy) ; de 7,10 à 7,35 (mt, 6H : H Aromatiques en 6 et H Aromatiques en méta de l'éthoxy) ; 7,43 (dd, J = 8 et 1 Hz, 1H : 1' H₄) ; 7,50 (dd, J = 8 et 4 Hz, 1H : 1' H₅) ; 7,77 (dd, J = 4 et 1 Hz, 1H : 1' H₆) ; 8,38 (d, J = 10 Hz, 1H : NH en 1) ; 8,70 (d, J = 9,5 Hz, 1H : NH en 6) ; 11,60 (s, 1H : OH).

10 **EXEMPLE 31 : Préparation de la 4 ζ -éthylthio-dés(4 ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A**

On réalise à l'échelle de 2 erlenmeyers comme décrit dans l'exemple 3 une culture de la souche SP92::pVRC508 en milieu de production avec ajout à 16h de 1 ml d'une solution à 20 g/l dans la soude 0,1N de chlorhydrate de 4-éthylthiophénylalanine (S) synthétisée comme à l'exemple 33. Au terme de 40 h de culture, les 60 ml de moût issus de 2 erlenmeyers sont extraits par 2 volumes d'un mélange de 66% de tampon phosphate 100 mM pH 2,9 et 34% d'acetonitrile, puis centrifugés. Le surnageant est extrait par 2 fois 0,5 volumes de dichlorométhane. Les phases chlorométhyléniques sont lavées à l'eau puis combinées, séchées sur sulfate de sodium et évaporées. L'extrait sec est repris par 20 ml de dichlorométhane et injecté sur une colonne de silice (30g) montée dans le dichlorométhane et éluée successivement par paliers de 0 à 10 % de méthanol dans le dichlorométhane. Les fractions contenant la 4 ζ -éthylthio-dés(4 ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A sont regroupées et évaporées. Le résidu sec est repris par 7 ml d'un mélange 60% eau et 40% acetonitrile et injecté sur une colonne semi-préparative Nucléosil 7 μ C8 10x250 mm (Macherey Nagel) éluée dans un mélange de 52% de tampon phosphate 100 mM pH 2,9 et 48% d'acetonitrile. Les fractions contenant la 4 ζ -éthylthio-dés (4 ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A sont regroupées et extraites par un volume de dichlorométhane. La phase organique est lavée à l'eau, séchée sur sulfate de sodium puis évaporée. On obtient ? mg de 4 ζ -éthylthio-dés (4 ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A.

Spectre de R.M.N. ¹ H (400 MHz, CDCl₃, δ en ppm) : 0,68 (dd, J = 16 et 6 Hz, 1H : 1H du CH₂ en 5 β) ; 0,92 (t, J = 7,5 Hz, 3H : CH₃ en 2 γ) ; de 1,10 à 1,40 (mt, 5H : 1H du CH₂ en 3 β et 1H du CH₂ en 3 γ et CH₃ de l'éthyle) ; 1,32 (d, J = 7

Hz, 3H : CH₃ en 1 γ) ; de 1,45 à 1,85 (mt, 3H : l'autre H du CH₂ en 3 γ et CH₂ en 2 β) ; 2,02 (mt, 1H : l'autre H du CH₂ en 3 β) ; 2,18 et 2,37 (respectivement mt et d large, J = 16,5 Hz, 1H chacun : CH₂ en 5 δ) ; 2,45 (d large, J = 16 Hz, 1H : l'autre H du CH₂ en 5 β) ; 2,85 (dt, J = 13 et 4 Hz, 1H : 1H du CH₂ en 5 ϵ) ; 2,90 (mt, 2H 5 : ArSCH₂ éthyle) ; 2,98 (dd, J = 12 et 4 Hz, 1H : 1H du CH₂ en 4 β) ; 3,25 (s, 3H : NCH₃) ; 3,35 (mt, 1H : 1H du CH₂ en 3 δ) ; 3,39 (t, J = 12 Hz, 1H : l'autre H du CH₂ en 4 β) ; 3,57 (mt, 1H : l'autre H du CH₂ en 3 δ) ; 4,55 (t, J = 7,5 Hz, 1H : 3 α) ; 4,75 (dd large, J = 13 et 7,5 Hz, 1H : l'autre H du CH₂ en 5 ϵ) ; 4,85 (mt, 1H : 2 α) ; 4,89 (dd, J = 10 et 1 Hz, 1H : 1 α) ; de 5,25 à 5,40 (mt, 2H : 5 α et 4 α) ; 10 5,88 (d, J = 9,5 Hz, 1H : 6 α) ; 5,91 (mt, 1H : 1 β) ; 6,55 (d, J = 9,5 Hz, 1H : NH en 2) ; 7,10 (d, J = 8 Hz, 2H : H Aromatiques en 4 δ) ; de 7,10 à 7,35 (mt, 7H : H Aromatiques en 6 et 4 ϵ) ; 7,44 (AB limite, 2H : 1' H₄ et 1' H₅) ; 7,74 (mt, 1H : 1' H₆) ; 8,38 (d, J = 10 Hz, 1H : NH en 1) ; 8,75 (d, J = 9,5 Hz, 1H : NH en 6) ; 11,62 (s, 1H : OH).

15

EXEMPLE 32 : Préparation de la 4 ζ -éthyl-dés(4 ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A

On réalise à l'échelle de 2 erlenmeyers comme décrit dans l'exemple 3 une culture de la souche SP92::pVRC508 en milieu de production avec ajout à 16h de 1 ml d'une solution à 20 g/l dans la soude 0,1N de 4-éthylphénylalanine (R,S) synthétisée comme à l'exemple 33. Au terme de 40 h de culture, les 60ml de moût issus des 2 erlenmeyers sont extraits par 2 volumes d'un mélange de 66% de tampon phosphate 100 mM pH 2,9 et 34% d'acétonitrile, puis centrifugés. Le surnageant est extrait par 2 fois volumes de dichlorométhane. Les phases chlorométhyléniques sont lavées à l'eau puis combinées, séchées sur sulfate de sodium et évaporées. L'extrait sec est repris par 20ml de dichlorométhane et injecté sur une colonne de silice (30g) montée dans le dichlorométhane et éluee successivement par paliers de 0 à 10 % de méthanol dans le dichlorométhane. Les fractions contenant la 4 ζ -éthyl-dés(4 ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A sont regroupées et évaporées. Le résidu sec est repris par 7ml d'un mélange 52% eau et 48% acétonitrile et injecté sur une colonne semi-préparative Nucléosil 7 μ C8 10x250 mm (Macherey Nagel) éluee dans un mélange de 52% de tampon phosphate 100 mM pH 2,9 et 48% d'acétonitrile. Les fractions contenant la 4 ζ -éthyl-dés(4 ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A sont regroupées et extraites par un volume de dichlorométhane. La phase organique est

lavée à l'eau, séchée sur sulfate de sodium puis évaporée. On obtient 0,50 mg de 4ζ -éthyl-dés(4ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A.

Spectre de R.M.N. ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ en ppm, ref. TMS): 0,42 (dd, J = 16 et 5,5 Hz, 1H : 1H du CH₂ en 5 β) ; 0,92 (t, J = 7,5 Hz, 3H : CH₃ en 2 γ) ; de 1,10 à 1,40 (mt, 2H : 1H du CH₂ en 3 β et 1H du CH₂ en 3 γ) ; 1,23 (t, J = 7,5 Hz, 3H : CH₃ de l'éthyle) ; 1,35 (d, J = 7 Hz, 3H : CH₃ en 1 γ) ; de 1,45 à 1,85 (mt, 3H : l'autre H du CH₂ en 3 γ et CH₂ en 2 β) ; 2,02 (mt, 1H : l'autre H du CH₂ en 3 β) ; 2,15 et de 2,25 à 2,40 (2 mts, 1H chacun : CH₂ en 5 δ) ; de 2,25 à 2,40 (mt, 1H : l'autre H du CH₂ en 5 β) ; 2,60 (q, J = 7,5 Hz, 2H : ArCH₂ de l'éthyle) ; 2,83 (dt, J = 13 et 4 Hz, 1H : 1H du CH₂ en 5 ϵ) ; 2,98 (dd, J = 12 et 4 Hz, 1H : 1H du CH₂ en 4 β) ; de 3,25 à 3,35 (mt, 1H : 1H du CH₂ en 3 δ) ; 3,27 (s, 3H : NCH₃) ; 3,39 (t, J = 12 Hz, 1H : l'autre H du CH₂ en 4 β) ; 3,59 (mt, 1H : l'autre H du CH₂ en 3 δ) ; 4,58 (dd, J = 7 et 6,5 Hz, 1H : 3 α) ; 4,75 (dd large, J = 13 et 8 Hz, 1H : l'autre H du CH₂ en 5 ϵ) ; 4,87 (mt, 1H : 2 α) ; 4,89 (dd, J = 10 et 1 Hz, 1H : 1 α) ; 5,24 (d large, J = 5,5 Hz, 1H : 5 α) ; 5,29 (dd, J = 12 et 4 Hz, 1H : 4 α) ; 5,88 (d, J = 10 Hz, 1H : 6 α) ; 5,92 (mt, 1H : 1 β) ; 6,73 (d, J = 10 Hz, 1H : NH en 2) ; de 7,10 à 7,35 (mt, 9H : H Aromatiques en 6 - 4 ϵ et 4 δ) ; 7,44 (dd, J = 8,5 et 1,5 Hz, 1H : 1' H₄) ; 7,50 (dd, J = 8,5 et 4,5 Hz, 1H : 1' H₅) ; 7,80 (dd, J = 4,5 et 1,5 Hz, 1H : 1' H₆) ; 8,38 (d, J = 10 Hz, 1H : NH en 1) ; 8,75 (d, J = 10 Hz, 1H : NH en 6) ; 11,66 (s, 1H : OH).

A partir des mêmes fractions issues de la colonne de silice décrite ci-dessus, contenant également le nouveau dérivé de pristinamycine I_H, 0,3mg de ζ -éthyl-dés(4ζ -diméthylamino) pristinamycine I_H sont isolés en opérant la chromatographie sur colonne semi-préparative comme décrit ci-dessus.

Spectre de R.M.N. ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ en ppm) : 0,04 (mt, 1H : 1H du CH₂ en 5 β) ; 0,92 (t, J = 7,5 Hz, 3H : CH₃ en 2 γ) ; de 1,10 à 1,40 (mt, 2H : 1H du CH₂ en 5 δ et 1H du CH₂ en 5 γ) ; 1,18 (t, J = 7,5 Hz, 3H : CH₃ de l'éthyle) ; 1,30 (d, J = 6,5 Hz, 3H : CH₃ en 1 γ) ; de 1,45 à 1,85 (mt, 7H : l'autre H du CH₂ en 5 γ - l'autre H du CH₂ en 5 δ - 1H du CH₂ en 3 β - CH₂ en 3 γ et CH₂ en 2 β) ; 1,81 (d large, J = 13 Hz, 1H : l'autre H du CH₂ en 5 β) ; 2,02 (mt, 1H : l'autre H du CH₂ en 3 β) ; 2,40 (dt, J = 13 et 4 Hz, 1H : 1H du CH₂ en 5 ϵ) ; 2,65 (q, J = 7,5 Hz, 2H : ArCH₂ de l'éthyle) ; 2,97 et 3,09 (respectivement dd et t, J = 12 et 5 Hz et J = 12 Hz, 1H chacun : CH₂ en 4 β) ; 3,50 et 3,60 (2 mts, 1H chacun : CH₂ en 3 δ) ; 4,13 (dd, J = 8 et 5 Hz, 1H : 3 α) ; 4,49 (d large, J = 13 Hz, 1H : l'autre H du CH₂ en 5

e) ; 4,70 (mt, 2H : 5 α et 4 α) ; 4,77 (mt, 1H : 2 α) ; 4,83 (dd, J = 10 et 1 Hz, 1H : 1 α) ; 5,50 (d, J = 7 Hz, 1H : 6 α) ; 5,74 (mt, 1H : 1 β) ; 6,09 (d, J = 4 Hz, 1H : NH en 4) ; 6,72 (mf, 1H : NH en 2) ; 7,07 (d, J = 8 Hz, 2H : H Aromatiques en 4 e) ; 7,15 (d, J = 8 Hz, 2H : H Aromatiques en 4 δ) ; de 7,15 à 7,35 (mt, 5H : H Aromatiques en 6) ; 7,40 (dd, J = 8 et 1 Hz, 1H : 1' H_a) ; 7,45 (dd, J = 8 et 4 Hz, 1H : 1' H_b) ; 7,92 (dd, J = 4 et 1 Hz, 1H : 1' H_c) ; 8,40 (mf, 1H : NH en 6) ; 8,50 (d, J = 10 Hz, 1H : NH en 1) ; 11,72 (s, 1H : OH).

10

EXEMPLE 33 : Préparation de dérivés de phénylalanine et d'acide phénylpyruvique déjà décrits.

15 La phénylalanine, et les dérivés 4-méthoxyphénylalanine, 4-bromophénylalanine, 4-chlorophénylalanine, 4-iodophénylalanine, 4-trifluorométhylphénylalanine, 4-aminophénylalanine, 3-méthoxyphénylalanine utilisés sont commerciaux.

20 Les dérivés suivants de phénylalanine peuvent être préparées selon les méthodes décrites dans la littérature.

4-Diméthylaminophénylalanine (RS)

D.F. Elliott, A.T. Fuller, C.R. Harrington, J. Chem. Soc., 1948, 85-89.

4-Diéthylaminophénylalanine (RS)

Moldaver B.L., Pushkareva Z.V., Zhur. Obshchei Khim., 31, 1560-1569 (1961);

C.A. 1961, 22226f.; J.A Stock, J. Chem. Soc, 1959, 90-97

4-Ethylaminophénylalanine (RS)

F. Bergel, J.A. Stock, J. Chem. Soc, 1959, 90-97.

4-Phénylphénylalanine (RS)

30 J.V. Braun, J. Nelles, Berichte, 66B, 1933, 1464-1470.

4-Méthylphénylalanine (RS)

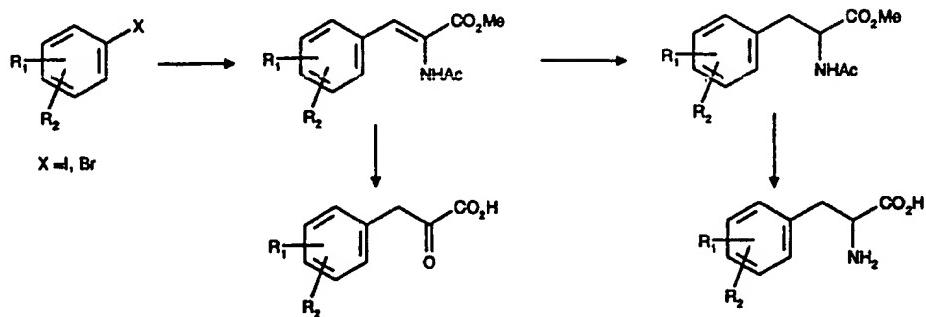
R.R.,Herr, T. Enjoki, J.P. Dailey, J. Am. Chem. Soc, 1957, 79, 4229-4231.

4-Méthylthiophénylalanine (RS) et 4- Ethylthiophénylalanine (R,S)

R.L.Colescott, R.R.Herr, J.P. Dailey J. Am. Chem. Soc, 1957, 79, 4232-4235.

- 4-Méthoxycarbonylphénylalanine (RS)**
H.Cleland, J. Org.Chem., 1969, 34, 747.
- 2,4 Diméthylphénylalanine (RS)**
R.R.,Herr, T. Enjoki, J.P. Dailey, J. Am. Chem. Soc, 1957, 79, 4229-4231.
- 5 **3,4 Diméthylphénylalanine (RS)**
R.R.,Herr, T. Enjoki, J.P. Dailey, J. Am. Chem. Soc, 1957, 79, 4229-4231.
- 3-Trifluorométhylphénylalanine (RS), chlorhydrate**
R. Filler and H.Novar, J. Org.Chem, 1960, 25, 733-736.
- 4-Aminométhyl phénylalanine (S)**
10 G.E. Stokker, W.F. Hoffman and C.F. Homnick, J.Org.Chem., 1993, 58, 5015-5017.
- 3- Méthylphénylalanine (R,S)**
J.H Burckhalter, V.C Stephens, J.A.C.S. 1951, 73, 56-58.
- 4-Acétyl phénylalanine (R,S)**
15 J.I. Degaw et coll., J. Med.Che., 1969, 11, 225-227
- 4-O-Allyl tyrosine (S)**
A. Loffet, H. Zang, Int. J. Pept. Protein Res. ,1993, 42, 346
- 4-O-Ethyl tyrosine (S)**
Y. Sasaki et coll, Chem. Pharm, Bull., 1982, 30, 4435
- 20 **4-Ethyl phénylalanine (RS)**
A. Zhuze et coll., Coll., Czech. Chem. Commm., 1965, 62, 2648
- L' acide 4-tert-butylphénylpyruvique peut être préparé suivant
R. Breslow, J.W. Canary, M. Varney, S.T. Waddell and D. Yang, J.
Am.Chem.Soc., 1990, 112, 5212-5219.
- 25 Les autres dérivés de phénylalanine ont été préparés suivant les exemples 34 à 42 indiqués ci-dessous. Dans ces exemples, les chromatographies flash sont effectuées sous une pression d'azote moyenne de 50 kPa, en utilisant une silice de granulométrie 40-53 µm, selon Still et al., J. Org. Chem., 43, 2923, (1978).
- 30

EXEMPLE 34: Préparation de dérivés de phénylalanine et d'un dérivé d'acide phénylpypyruvique par la méthode A.



5

34-1: 4-Méthylaminophénylalanine (RS), dichlorhydrate

A 3,70 g de N-acétyl 4-méthylaminophénylalaninate de méthyle on ajoute 37 ml d'acide chlorhydrique 12 N et le mélange est chauffé au reflux sous agitation pendant 8 h. Après une nuit à température ambiante, le milieu réactionnel est concentré à sec sous pression réduite (50 kPa), repris par un mélange de 50 ml de toluène et 50 ml d'éthanol puis à nouveau concentré. Après séchage en dessicteur sous pression réduite (2,6 kPa), on obtient 4,18 g (100%) de dichlorhydrate de 4-méthylaminophénylalanine (RS) sous forme d'un solide beige clair hygroscopique fondant à 158°C.

15

34-2: N-Acétyl 4-méthylaminophénylalaninate de méthyle (RS)

A 4 g de 4-méthylamino 2-acétamido cinnamate de méthyle placé sous atmosphère d'azote dans un autoclave, on ajoute 0,4 g de palladium sur charbon à 10% puis 50 ml d'éthanol absolu. Le mélange est placé sous une pression de 5,5 bars d'hydrogène et chauffé 15 h à 50°C sous agitation. Après stabilisation de la température à 26°C et remise à pression atmosphérique, le milieu réactionnel est filtré sur Clarcel®, rincé à l'éthanol puis concentré à sec sous pression réduite (2,6 kPa). On obtient ainsi 3,73 g de N-acétyl 4-méthylaminophénylalaninate de méthyle sous forme de cristaux blancs fondant à 118°C.

25

34-3: 4-Méthylamino 2-acétamido cinnamate de méthyle

Dans un tricol placé sous azote on ajoute 5,75 g de 2-acétamido acrylate de méthyle, 0,185 g d'acétate de palladium, 8,1 g de chlorure de tétrabutyl ammonium et 5 6,03 g d'hydrogénocarbonate de sodium puis on additionne à ce mélange 6,5 g de 4-iodo N-méthylaniline en solution dans 200 ml de DMF. Le mélange est chauffé 16 h 30 mn à 82°C puis après refroidissement versé sur 1000 ml d'eau distillée. Le milieu est repris par 250 ml de CH₂Cl₂, la phase organique est décantée et la phase aqueuse lavée par 2 fois 250 ml de CH₂Cl₂. Les phases organiques sont rassemblées, séchées 10 sur sulfate de sodium, filtrées et concentrées sous pression réduite (50 kPa) à 70°C pour donner une huile brune qui est purifiée par flash-chromatographie (éluant AcOEt / cyclohexane puis AcOEt pur).

On obtient ainsi 4 g de 4-méthylamino 2-acétamido cinnamate de méthyle, sous forme d'un solide jaune (Silice Merck 5719, R_f= 0,48) qui est utilisé tel quel.

15 La N-méthyl-p-iodoaniline peut être préparée suivant : S. Krishnamurthy, Tetrahedron Letters, 33, 3315-3318, 1982.

34-4: Acide 4-méthylamino phénylpyruvique

20 On place dans un ballon 2,4 g de 4-méthylamino 2-acétamido cinnamate de méthyle et 32 ml d'acide chlorhydrique 12 N. Le mélange est chauffé au reflux 3 h puis refroidi et lavé par 2 fois 20 ml d'éther diéthylique. La phase aqueuse est refroidie à -10°C et le précipité obtenu est filtré puis rinçé par un minimum d'acide chlorhydrique froid. Le solide obtenu est séché au dessicteur sous pression réduite 25 pour donner 1,1 g d'acide 4-méthylamino phénylpyruvique sous forme d'un solide beige clair fondant à 210°C.

34-5: 3-Fluoro 4-méthylphénylalanine (R,S), chlorhydrate

30 En opérant comme à l'exemple 34-1 mais à partir de 1,6 g de N-Acétyl (3-fluoro-4 méthyl) phénylalaninate de méthyle, on obtient 0,6 g de chlorhydrate de 3-fluoro 4-méthyl phénylalanine (R,S) sous forme de cristaux blancs fondant à une température supérieure à 260°C.

34-6: N-Acetyl (3-fluoro-4-methyl) phenylalaninate de methyle (R,S)

En opérant comme à l'exemple 34-2 mais à partir de 1,9 g de (4-méthyl 3-fluoro) 2-acétamido cinnamate de méthyle, de 0,2 g de palladium sur charbon à 10% dans 230 ml d'éthanol, on obtient 1,6 g de N-acetyl (3-fluoro-4 méthyl) phénylalaninate de méthyle sous forme d'une huile incolore (Silice Merck 5719, Rf= 0,46; éluant CH₂Cl₂ / AcOEt 50/50).

34-7: (3-Fluoro 4-méthyl) 2-acétamido cinnamate de méthyle

10 En opérant comme à l'exemple 34-3 mais à partir de 3,6 g de 2-acétamido acrylate de méthyle, 0,12 g d'acétate de palladium, 5,2 g de chlorure de tétrabutyl ammonium, de 3,8 g d'hydrogénocarbonate de sodium et de 4 g de 2-fluoro 4-bromo toluène en solution dans 120 ml de DMF anhydre, on obtient 2,6 g de (3-fluoro 4-méthyl) 2-acétamido cinnamate de méthyle sous forme d'un solide blanc fondant à 163°C.

34-8: 4-Trifluorométhoxyphénylalanine (R,S). chlorhydrate ou Ω-trifluorométhyl tyrosine. chlorhydrate (R,S)

20 En opérant comme à l'exemple 34-1 mais à partir de 3 g de N-acetyl (4-trifluorométhoxy) phénylalaninate de méthyle et de 30 ml d'acide chlorhydrique 12 N, on obtient 1,5 g de chlorhydrate de 4-trifluorométhoxy phénylalanine (RS) sous forme de cristaux blancs fondant à 260°C.

34-9: N-Acetyl (4-trifluorométhoxy) phénylalaninate de méthyle (R,S)

25 En opérant comme à l'exemple 34-2 mais à partir de 3,1 g de (4-trifluorométhoxy) 2-acétamido cinnamate de méthyle, de 0,3 g de palladium sur charbon à 10% dans 50 ml d'éthanol, on obtient 3 g de N-acetyl (4-trifluorométhoxy) phénylalaninate de méthyle sous forme d'un solide blanc fondant à 80°C.

34-10: 4-Trifluorométhoxy 2-acétamido cinnamate de méthyle

30 En opérant comme à l'exemple 34-3 mais à partir de 4,3 g de 2-acétamido acrylate de méthyle, 0,14 g d'acétate de palladium, 6,1 g de chlorure de tétrabutyl

ammonium, de 4,6 g d'hydrogénocarbonate de sodium et de 5 g de 4-trifluorométhoxy bromo benzène en solution dans 150 ml de DMF anhydre.

On obtient 3,1 g de (4-trifluorométhoxy) 2-acétamido cinnamate de méthyle sous forme d'un solide blanc fondant à 135°C.

5

34-11: 3-Méthylthiophénylalanine (RS), chlorhydrate

En opérant comme à l'exemple 34-1 mais à partir de 3,3 g de N-acétyl 3-méthylthio phénylalaninate de méthyle et de 40 ml d'acide chlorhydrique 12N, on 10 obtient 1,38 g de chlorhydrate de 3-méthylthio phénylalanine (RS) sous forme de cristaux blancs fondant à 190°C.

34-12: N-Acetyl 3-méthylthio phénylalaninate de méthyle (RS)

15 On place dans un ballon 3,72 g de 3-méthylthio 2-acétamido cinnamate de méthyle en solution dans 100 ml de méthanol et 30 ml de tétrahydrofurane puis on ajoute 1,4 g de magnésium. Après 20 mn de réaction on refroidi le milieu par un bain de glace puis on ajoute à nouveau 1,4 g de magnésium. Le mélange est agité à température ambiante pendant 18 h, versé sur 1,4 l d'eau distillée et 300 ml de 20 CH₂Cl₂ puis filtré sur Clarcel®. La phase aqueuse est ajustée à pH 6 par addition d'acide chlorhydrique 12 N puis décantée et lavée par 100 ml de CH₂Cl₂. Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur sulfate de magnésium, filtrées puis concentrées à sec sous pression réduite pour donner 3,42 g de N-acétyl 3-méthylthio phénylalaninate de méthyle sous forme d'une huile incolore (Silice Merck 5719, Rf= 25 0,5 ; AcOEt).

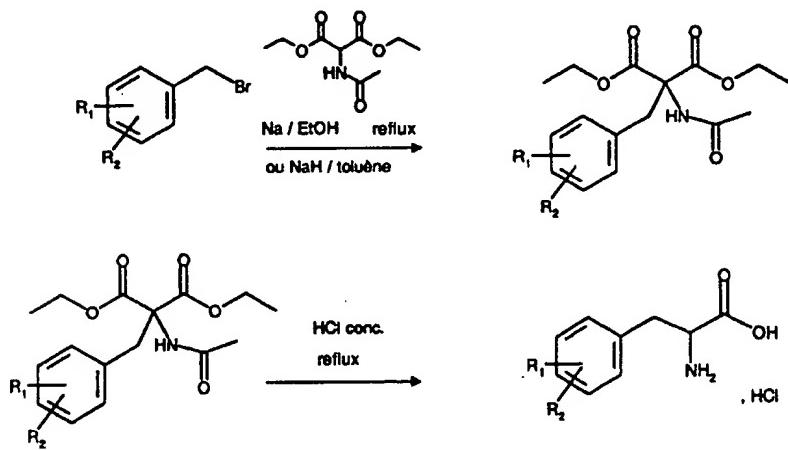
34-13: 3-Méthylthio 2-acétamido cinnamate de méthyle

En opérant comme à l'exemple 34-3 mais à partir de 5,6 g de 2-acétamido acrylate de méthyle, 0,18 g d'acétate de palladium, 8,2 g de chlorure de tétrabutyl ammonium, de 5,86 g d'hydrogénocarbonate de sodium et de 6,5 g de 3-iodo 1-méthylthiobenzène en solution dans 160 ml de DMF anhydre, on obtient 4,8 g de (3-méthylthio) 2-acétamido cinnamate de méthyle sous forme d'un solide blanc fondant à 139°C.

34-14: 3-Iodométhylthiobenzène

On place sous agitation dans un tricol 20 ml d'eau distillée et 20 ml d'acide chlorhydrique 12 N puis on ajoute par une ampoule de coulée 10 ml de 3-méthylthio aniline. Le mélange est tiédi pour assurer la dissolution puis refroidi à 5°C. On ajoute ensuite lentement par une ampoule de coulée 5,86 g de nitrite de sodium en solution dans 15 ml d'eau en maintenant la température entre 5 et 8°C. 20mn après la fin de l'addition, 13,57 g de iodure de potassium en solution dans 15 ml d'eau sont ajoutés en 10mn puis le mélange est agité 15 h à température ambiante. L'huile formée est séparée de la phase aqueuse par décantation, puis additionnée d'une solution aqueuse de thiosulfate de sodium. La phase aqueuse est décantée, et le produit extrait par 100 ml de dichlorométhane. La phase organique est lavée avec 100 ml d'eau, la phase aqueuse ajustée à pH 9 avec de la soude concentrée puis décantée. La phase organique est lavée par 2 fois 100 ml d'eau, décantée, séchée sur sulfate de magnésium, filtrée puis concentrée à sec sous pression réduite (50 kPa) à 40°C. Le produit résultant est purifié par chromatographie flash (éluant cyclohexane) pour donner 13 g de 3-iodo 1-méthylthiobenzène sous forme d'un liquide jaune (Silice Merck 5719, R_f= 0,8 / cyclohexane).

EXEMPLE 35 : Préparation de dérivés de phénylalanine par la méthode B.



35-1: 4-tert-Butylphénylalanine (R,S)

Dans un tricol surmonté d'un réfrigérant sont additionnés 25 g de 4-(tert butyl) benzyl acétamidomalonate de diéthyle et 250 ml d'acide chlorhydrique à 37%. Le mélange est agité et chauffé au reflux jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de dégagement gazeux. Après refroidissement du milieu réactionnel le précipité obtenu est filtré puis recristallisé dans l'acétonitrile pour donner 25, 6 g de chlorhydrate de 4-tert-butylphénylalanine (R,S) sous forme d'un solide blanc fondant à 234°C. (Voir également Journal of the Takeda Research Laboratories Vol. 43; N°3/4, Déc1984 p53-76).

35-2: 4-(tert butyl) benzyl acétamidomalonate de diéthyle

Dans un tricol surmonté d'un réfrigérant sont additionnés sous atmosphère d'azote, 25 g de bromure de 4-tert-butyl benzyle, 50 ml de toluène anhydre et 3,1 g d'hydrure de sodium en suspension dans l'huile à 80% puis 21,8 g d' acétamido malonate de diéthyle. Le mélange est chauffé à 110°C pendant 17 h. Après refroidissement on ajoute lentement à l'aide d'une ampoule de coulée, 15 ml d'éthanol absolu puis 15 ml d'éthanol à 50% puis 50 ml d'eau. La phase organique est décantée et la phase aqueuse lavée par 3 fois 50 ml d'éther diéthylique. Les phases organiques sont réunies, lavées à l'eau puis séchées sur sulfate de sodium. Après filtration et concentration sous pression réduite, le produit est cristallisé dans l'éther de pétrole pour donner 25 g de 4-(tert-butyl) benzyl acétamidomalonate de diéthyle sous forme d'un solide blanc fondant à 80°C.

25

35-3: 3-Méthylaminophénylalanine (R,S). dichlorhydrate

En opérant comme à l'exemple 35-1 mais à partir de 1,17 g 3-méthylamino benzyl acétamidomalonate de diéthyle et 20 ml d'acide chlorhydrique 12 N, on obtient 1, 03 g d'un solide jaune beige. Celui-ci est dissous dans 20 ml d'éthanol absolu et additionné de 0,4 g de noir animal. La solution est filtrée sur Clarcel®, puis filtrée et concentrée sous pression réduite (50 kPa) La même opération est recommandée avec 1 g de noir animal et le solide obtenu trituré dans 20 ml d'éther. Après filtration et séchage sous pression réduite (2,7 kPa) à 50°C, on obtient 0,65 g

de dichlorhydrate de 3-méthylaminophénylalanine (R,S) sous forme d'une poudre blanche fondant vers 135°C (décomposition).

35-4: 3-Méthylamino benzyl acétamidomalonate de diéthyle

5

On place dans un tricol maintenu sous atmosphère d'azote 3,11 ml d'anhydride acétique. On ajoute ensuite en 3 mn à 0°C, 1,51 ml d'acide formique puis on chauffe à 50°C pendant 2 heures. On laisse le mélange revenir à température ambiante en agitant pendant 3h 20 et on ajoute 4 ml de THF anhydre sous azote et on refroidi à -20°C. On ajoute en 10 mn, une solution de 4 g de 3-aminobenzyl acétamidomalonate de diéthyle dans un mélange de 15 ml de THF anhydre et de 15 ml de dichlorométhane anhydre. L'agitation est poursuivie 1h 10mn à -20°C puis à 20°C pendant 16 h. Le mélange réactionnel est concentré à sec sous pression réduite (50 kPa) à 30°C, puis coévaporé avec 30 ml de toluène anhydre pour donner un solide blanc qui est dissous dans un mélange de 10 ml de THF anhydre et de 20 ml de dichloro 1,2 éthane anhydre puis placé dans un tricol sous azote.

Le milieu est refroidi à -5°C puis 1,55 ml de complexe borane-diméthylsulfure (solution 2M dans le THF) est ajouté en 10 mn. On laisse le milieu revenir à température ambiante et la solution est chauffée 3 h au reflux puis agitée 15 h à température ambiante. Le milieu réactionnel est refroidi à 0°C puis on ajoute en 25 mn, 10 ml de MeOH. On agite 45 mn à 0°C puis 30 mn à température ambiante. On refroidit à 0°C puis on fait barboter HCl gaz jusqu'à pH 2. On chauffe 1 h à reflux puis le mélange est concentré à sec sous pression réduite à 30°C pour donner 5 g d'un produit qui est repris par 30 ml d'une solution aqueuse de NaHCO₃ et de 30 ml de CH₂Cl₂. La phase organique est décantée et la phase aqueuse lavée par 20 ml d'eau. Les phases organiques sont réunies, séchées sur sulfate de magnésium, filtrées puis concentrées à sec sous pression réduite (2,6 kPa) pour donner 3,43 g d'une huile jaune qui est purifiée par chromatographie flash (éluant AcOEt-cyclohexane 50/50). On obtient ainsi après séchage sous pression réduite (2,7 kPa) à 20°C, 1,18 g de 3-méthylamino benzyl acétamidomalonate de diéthyle sous forme d'un solide beige clair fondant à 122°C.

35-5: 3-Aminobenzyl acétamidomalonate de diéthyle

Le 3-amino benzyl acétamidomalonate de diéthyle peut être préparé comme décrit dans :

- 5 T.S. Osdene, D.N.Ward, W.H. Chapman and H. Rakoff, J. Am. Chem. Soc.,
81, 1959, 3100-3102.

35-6: 3-Ethylaminophénylalanine (R,S). dichlorhydrate

- 10 En opérant comme à l'exemple 34-1 mais à partir de 2 g de N-acétyl 3-éthylamino phénylalaninate d'éthyle(R,S) et de 30 ml d'acide chlorhydrique 12N, on obtient 1,7 g de dichlorhydrate de 3-éthylamino phénylalanine (R,S) sous forme d'un solide beige clair hygroscopique contenant 10% molaire de dichlorhydrate de 3-diéthylamino phénylalanine (R,S).

- 15 35-7: N-Acétyl 3-éthylamino phénylalaninate d'éthyle(R,S)

- On place dans un ballon sous atmosphère d'azote, 3 g de N-acétyl 3-amino phénylalaninate d'éthyle (R,S), 40 ml d'éthanol et 14 g de nickel de Raney préalablement lavé à l'eau distillée et à l'éthanol. Le mélange est chauffé au reflux 19 h, refroidi, filtré sur Clarcel® puis concentré à sec sous pression réduite (50 kPa) pour donner 3,07 g d'une huile incolore qui est purifiée par chromatographie flash (éluant AcOEt) pour donner 2,1 g de N-acétyl 3-éthylamino phénylalaninate d'éthyle (R,S) sous forme d'une huile incolore (Silice Merck 5719, Rf= 0,6 :AcOEt) contenant 25 10% de N-acétyl 3-diéthylamino phénylalaninate d'éthyle (R,S).

35-8: N-acétyl 3-amino phénylalaninate d'éthyle(R,S)

- 25 g d'un mélange de N-acétyl 3-nitro phénylalaninate d'éthyle (R,S) (75% mol./mol.) et de 3-nitro benzyl acétamidomalonate de diéthyle (25% mol./mol.) sont placés sous azote dans un autoclave. On ajoute 2,5 g de palladium sur charbon à 10% puis 200ml de dichlorométhane. Le mélange est placé sous une pression de 9 bars d'hydrogène puis agité à 18°C pendant 4 h. Après remise à la pression atmosphérique, le milieu réactionnel est filtré sur Clarcel®, rincé par du dichlorométhane puis concentré à sec sous pression réduite (50 kPa) pour donner un solide qui est

recristallisé dans 450 ml d'eau distillée au reflux en présence de 4 g de noir animal 3S. Après filtration à chaud sur Clarcel® la cristallisation est abandonnée à 4°C, les cristaux sont filtrés puis séchés pour donner 9,9 g de N-acétyl 3-amino phénylalaninate d'éthyle (R,S) sous forme d'un solide beige clair fondant à 106°C et 5 contenant 5% de 3-amino benzyl acétamido malonate de diéthyle.

35-9: N-acétyl 3-nitro phénylalaninate d'éthyle(R,S) et 3-nitro benzyl acétamidomalonate de diéthyle.

10 Dans un tricol surmonté d'un réfrigérant sont placés sous atmosphère d'azote, 600 ml d'éthanol absolu puis 7,9 g de sodium. Après dissolution totale, on ajoute 74,5 g d' acétamido malonate de diéthyle puis 60 g de chlorure de 4-nitro benzyle dans 200 ml d'éthanol anhydre. Le mélange est chauffé au reflux pendant 16h 30mn. Après refroidissement le milieu réactionnel est concentré sous pression réduite (50 kPa) puis 15 repris par un mélange de 500 ml de CH₂Cl₂ et de 500 ml d'eau. Le pH est ajusté à 7 par addition d'acide sulfurique 0,5N puis la phase organique est décantée et la phase aqueuse lavée par 2 fois 200 ml de CH₂Cl₂. Les phases organiques sont réunies, lavées avec 200 ml d'eau saturée en bicarbonate de sodium, décantée puis séchées sur sulfate de magnésium. Après filtration et concentration sous pression réduite (50 20 kPa), le produit est recristallisé dans 600 ml d'éthanol au reflux pour donner après cristallisation à température ambiante, filtration et séchage, 70,4 g de 3-nitro benzyl acétamidomalonate de diéthyle.sous forme de cristaux blancs fondant à 156°C. Les eaux-mères sont concentrées puis purifiées par chromatographie flash (éluant AcOEt) pour donner 25,6 g d' un mélange de N-acétyl 3-nitro phénylalaninate d'éthyle (75% 25 mol/mol) et de 3-nitro benzyl acétamidomalonate de diéthyle (25% mol/mol) sous forme d'un solide beige clair utilisé tel que dans l'étape suivante.

35-10 : 3-Diméthylamino phénylalanine (RS). dichlorhydrate

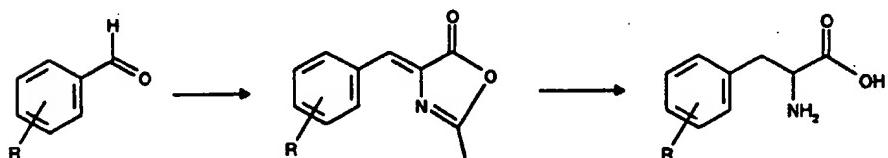
30 En opérant comme à l'exemple 35-1 mais à partir de 0,72 g de N-acétyl 3-diméthylamino phénylalaninate d'éthyle (RS) et de 8,6 ml d'acide chlorhydrique à 10N, on obtient après évaporation un solide qui est trituré dans 50ml d'acétone, filtré puis séché sous pression réduite (2,7 kPa) à 40°C. On obtient 0,68 g (93%) de 35 dichlorhydrate de 3-diméthylamino phénylalanine (RS) sous forme d'un solide blanc fondant vers 120°C (décomposition).

35-11: N-acétyl 3-diméthylamino phénylalaninate d'éthyle (RS)

On place dans un tricol sous atmosphère d'azote, 4g de N-acétyl 3-amino phénylalaninate d'éthyle (RS), préparé comme décrit à l'exemple 35-8 dans 15ml de DMF et on ajoute 5,5 ml de triéthylamine puis 2,5 ml de iodure de méthyle et 4 ml de dichlorométhane en maintenant la température vers 30°C à l'aide d'un bain de glace. Le mélange est ensuite chauffé 18h à 35°C. On ajoute alors lentement 1ml de iodure de méthyle en solution dans 1ml de DMF en maintenant la température vers 30°C, 10 puis 2,2ml de triéthylamine puis le mélange est chauffé 5h supplémentaires à 35°C. Le mélange est ramené à température ambiante puis extrait par 100ml d'acétate d'éthyle et 150ml d'eau distillée. La phase aqueuse est décantée puis relavée par 2 fois 70ml d'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont réunies, lavées par 2 fois 80 ml d'eau distillée puis par 50ml d'eau distillée saturée en NaCl. La phase organique est 15 décantée, séchée sur sulfate de magnésium, filtrée, puis concentrée à sec sous pression réduite pour donner 2,4g d'un produit qui est purifié par chromatographie flash (dichlorométhane, MeOH 90/10). On obtient ainsi 0,72g (16%) de 3-N-acétyl 3-diméthylamino phénylalaninate d'éthyle (RS) sous forme de cristaux jaunes.

20

EXEMPLE 36: Préparation de dérivés de phénylalanine par la méthode C.

25 36-1: 4-Isopropylphénylalanine (R,S)

On place dans un tricol 7 g de phosphore rouge et 8 g de 4-(isopropyl benzylidène) 2-méthyl 5-oxazolone dans 45 ml d'anhydride acétique puis on ajoute lentement sous agitation à l'aide d'une ampoule de coulée 35 ml d'acide iodhydrique à 30 57%. En fin d'addition le mélange est chauffé 3h 30mn au reflux puis laissé 3 jours à température ambiante. Le milieu réactionnel est filtré, le solide obtenu rincé par 2 fois 10 ml d'acide acétique puis le filtrat concentré à sec sous pression réduite. Le

résidu obtenu est repris par 100 ml d'eau distillée, concentré à sec sous pression réduite pour donné un solide qui est repris dans 50 ml d'eau distillée puis extrait par 3 fois 50 ml d'éther diéthylique après addition de 0,5g de sulfite de sodium. L'éther est décanté et la phase aqueuse placée sous pression réduite pour éliminer les traces 5 d'éther diéthylique. On ajoute à la phase aqueuse 2 g de noir animal, on chauffe à 40-50°C, on filtre sur Clarcel® puis on rince avec un minimum d'eau. Le pH est ajusté à 5 par addition, à 4°C, d'ammoniaque à 32%. Le précipité obtenu est filtré à froid, rinçé par 2 fois 10 ml d'eau, 10 ml 'éthanol puis par 2 fois 10 ml d'éther pour donner 10 après sèchage sous pression réduite à 20°C, 3,97 g de 4-isopropylphénylalanine (R,S) sous forme d'un solide blanc fondant à une température supérieure à 260°C. (Voir également Journal of the Takeda Research Laboratories Vol. 43; N°3/4, Déc1984 p53-76).

36-2: 4-(isopropyl benzylidène) 2-méthyl 5-oxazolone

15 On place dans un ballon muni d'un réfrigérant, 18,52 g de N-acétylglycine, 10,6 g d'acétate de sodium, 20 ml de 4-isopropylbenzaldéhyde et 57 ml d'anhydride acétique. On agite 30 mn puis le mélange est agité 1 h à 110°C puis 15 h à température ambiante. Le milieu réactionnel est versé sur 600 ml d'eau et 400 ml 20 d'éther de pétrole préalablement chauffé à 50°C. La phase organique est décantée et la phase aqueuse lavée par 2 fois 150 ml d'éther de pétrole.

Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur sulfate de magnésium, filtrées et concentrées sous pression réduite jusqu'à 100 ml et obtention d'un précipité. Celui-ci est filtré, lavé par 2 fois 50 ml de pentane pour donner 8,2 g de 4-(isopropyl 25 benzylidène) 2-méthyl 5-oxazolone sous forme d'un solide jaune fondant à 77°C.

36-3: 4-butylphénylalanine (R,S)

En opérant comme à l'exemple 36-1 mais à partir de 1,49 g de phosphore rouge, 30 de 1,8 g de 4-(butyl benzylidène) 2-méthyl 5-oxazolone dans 9,23 ml d'anhydride acétique et de 7,39 ml d'acide iodhydrique à 57%, on obtient 0,35 g de 4-butylphénylalanine (R,S) sous forme d'un solide beige clair fondant à une température supérieure à 260°C.

36-4: 4-(butyl benzylidène) 2-méthyl 5-oxazolone

En opérant comme à l'exemple 36-2 mais à partir de 8,43 g de N-acétylglycine,
5 4,92 g d'acétate de sodium, 9,8 g de 4-butylbenzaldéhyde et 26 ml d'anhydride acétique, on obtient 1,89 g de 4-(butyl benzylidène) 2-méthyl 5-oxazolone, sous forme d'un solide jaune fondant à 74°C.

10

EXAMPLE 37 : Préparation d'un dérivé de phénylalanine par la méthode D.**37-1: 3-Ethoxy phénylalanine(R,S), chlorhydrate (ou 3-O-Ethyltyrosine (R,S), chlorhydrate)**

On place dans un ballon 1 g de N-tert butoxy carbonyl 3-éthoxy phénylalanine (R,S) en solution dans 3,6 ml de dioxane chlorhydrique puis le mélange est agité 5 h à température ambiante. Le précipité formé est filtré, rinçé par du dioxane puis à 20 l'éther puis séché sous pression réduite (2,7 kPa) à 40°C pour donner 0,65 g de 3-éthoxy phénylalanine (R,S), chlorhydrate sous forme d'un solide blanc fondant à 200°C.

37-2: N-tert Butoxy carbonyl 3-éthoxy phénylalanine (R,S)

On place dans un ballon 1,33 g de N-tert butoxy carbonyl 3-éthoxy phénylalaninate d'éthyle (R,S) en solution dans 8 ml de méthanol puis on ajoute 8 ml de soude 1N. Après 18 h d'agitation à température ambiante, le mélange est évaporé sous pression réduite, puis acidifié par 8,56 ml d'acide chlorhydrique 1N. Le produit est extrait par 2 fois 10 ml d'acétate d'éthyle, les phases organiques sont réunies, lavées par 2 fois 10 ml d'eau, séchées filtrées puis concentrées à sec sous pression réduite pour donner 1 g de N-tert butoxy carbonyl 3-éthoxy phénylalanine (R,S) sous forme d'une huile jaune (Silice Merck 5719, Rf= 0,7, éluant : toluène 80 / MeOH 10 / diéthylamine 10).

35

37-3: N-tert Butoxy carbonyl 3-éthoxy phénylalaninate d'éthyle (R,S)

On place dans un tricol sous atmosphère d'azote, 1,5 g de N-tert butoxy carbonyl 3-tyrosine (R,S) en solution dans 7,5 ml de DMF sec puis on ajoute, 0,508 g 5 d'hydrure de sodium à 50% dans l'huile. Après 2 h d'agitation à température ambiante on ajoute 0,86 ml de iodoéthane puis le mélange est agité 4 h à température ambiante. Le milieu est filtré, le solide résultant lavé par 3 fois 10 ml d'eau puis 2 fois 10 ml 10 d'éther de pétrole pour donner après séchage sous pression réduite (2,7 kPa) à 30°C, 1,33 g de N-tert butoxy carbonyl 3-éthoxy phénylalaninate d'éthyle (R,S) sous forme d'un solide blanc.

37-4: N-tert Butoxy carbonyl 3-tyrosine (R,S)

On place sous agitation dans un tricol, 18 g de 3-tyrosine (R,S) en solution dans 15 180 ml de dioxane puis on ajoute 99 ml de soude 1N puis 26 g de di-tert butyl dicarbonate en solution dans 160 ml de dioxane. Après 36 h d'agitation le milieu est concentré sous pression réduite à 30°C, repris avec 100 ml d'eau distillée, acidifié avec de l'acide chlorhydrique 1N jusqu'à pH 5 puis extrait par 2 fois 200 ml d'acétate 20 d'éthyle. La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium, filtrée puis concentrée à sec sous pression réduite à 30°C, pour donner 30 g de N-tert butoxy carbonyl 3-tyrosine (R,S) sous forme d'un solide blanc (Silice Merck 5719, Rf= 0,25, éluant : toluène 80, MeOH 10, diéthylamine 10).

25 EXEMPLE 38: Préparation de dérivés de phénylalanine par la méthode E.**38- 1: 4-Diallylaminophénylalanine (RS), dichlorhydrate**

En opérant comme à l'exemple 35-1 mais à partir de 5,8 g de 4-30 diallylaminobenzyl acétamido malonate de diéthyle et de 48 ml d'acide chlorhydrique 10N, on obtient après évaporation un solide qui est trittré dans 50ml d'acétone, filtré puis trittré dans 10ml de dichlorométhane, filtré, puis rincé par 3 fois 10 ml d'éther éthylique. Après séchage sous pression réduite (2,7 kPa) à 40°C, on obtient 4,41 g de

dichlorhydrate de 4-diallylaminophénylalanine (RS) sous forme d'un solide blanc cassé fondant vers 135°C (décomposition).

38- 2: 4-Allylaminophénylalanine (RS), dichlorhydrate

5

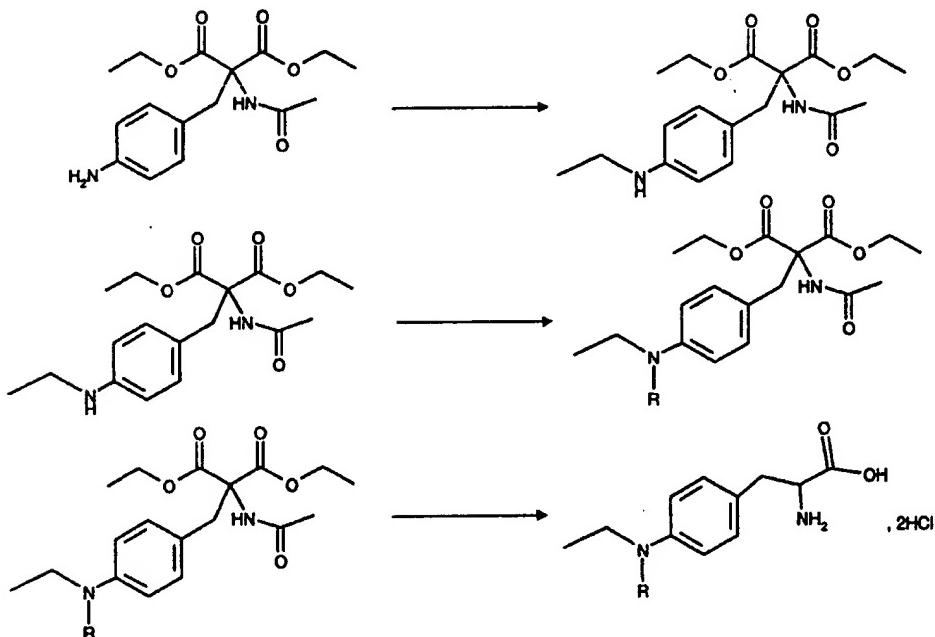
En opérant comme à l'exemple 35-1 mais à partir de 3,27 g de 4-allylaminobenzyl acétamido malonate de diéthyle et de 30 ml d'acide chlorhydrique 10N, on obtient après évaporation un solide qui est tritiqué dans 50ml d'acétone, filtré puis séché sous pression réduite (2,7 kPa) à 40°C. On obtient 2,3 g de dichlorhydrate de 4-allylaminophénylalanine (RS) sous forme d'un solide blanc fondant vers 134°C (décomposition).

15 38-3: 4-Diallylaminobenzyl acétamido malonate de diéthyle et 4-Allylaminobenzyl acétamido malonate de diéthyle

On place dans un tricol surmonté d'une ampoule de coulée et maintenu sous atmosphère d'azote 10g de 4-aminobenzylacétamidomalonate de diéthyle en solution dans 150ml de DMF. On ajoute lentement à température ambiante, 6,57 ml de bromure d'allyle puis 10,76ml de triéthylamine sous agitation. Après 19 h d'agitation on ajoute à nouveau, 1,31ml de bromure d'allyle et 2,15ml de triéthylamine et le mélange est agité 26h. Le milieu réactionnel est versé sur 1,5l d'eau distillée et extrait par 1l d'acétate d'éthyle. La phase aqueuse est décantée, lavée par 2 fois 500ml d'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont réunies, lavées par 500ml d'eau distillée puis par 500ml d'eau saturée en chlorure de sodium, décantées, séchées sur sulfate de magnésium, filtrées puis concentrées à sec pour donner une huile marron qui est purifiée par chromatographie flash (éluant CH₂Cl₂ 90/ AcOEt 10) pour donner 6,66 g de 4-diallylaminobenzyl acétamido malonate de diéthyle sous forme d'un solide beige fondant à 94-96°C (Rf =0,6 AcOEt 50/ cyclohexane 50) et 3,49g de 4-allylaminobenzyl acétamido malonate de diéthyle sous forme d'un solide beige fondant à 104-106°C (Rf =0,45 AcOEt 50/ cyclohexane 50)

Le 4-aminobenzyl acétamido malonate de diéthyle peut être préparé comme décrit dans J.B. Burckhalter, VC Stephens, J. Am. Chem. Soc., 56, 1951, 73.

EXEMPLE 39: Préparation de dérivés de phénylalanine par la méthode F



5

39-1: 4-Ethyl isopropyl phénylalanine (RS), dichlorhydrate

En opérant comme à l'exemple 35-1 mais à partir de 2,9 g de 4-éthyl isopropylbenzyl acétamido malonate de diéthyle et de 24,6 ml d'acide chlorhydrique 10N, on obtient après évaporation un solide qui est trituré dans 20 ml d'acétone, filtré puis séché sous pression réduite (2,7 kPa) à 40°C. On obtient 2 g de dichlorhydrate de 4-éthyl isopropylaminophénylalanine (RS) sous forme d'un solide blanc fondant vers 147°C (décomposition).

15

39-2: 4-Ethyl isopropyl aminobenzyl acétamido malonate de diéthyle

On place dans un tricol maintenu sous atmosphère d'azote, 15g de 4-éthyl aminobenzylacétamido malonate de diéthyle dans 70ml de THF, on ajoute 6,4ml de 2-iodopropane puis 8,4ml de 1,5-diazabicyclo[4.3.0]non-5-ène puis le mélange est 20 chauffé 24h à 60°C. On ajoute alors 2,13ml de 2-iodopropane, puis 8,4ml de 1,5-

diazabicyclo[4.3.0]non-5-ène puis le mélange est chauffé 24h supplémentaires à 60°C.

Le mélange est ramené à température ambiante puis extrait par 50ml de dichlorométhane et 50ml d'eau distillée. La phase aqueuse est décantée puis relavée 5 par 2 fois 30ml de dichlorométhane. Les phases organiques sont réunies, lavées par 60 ml d'eau distillée puis par 50ml d'eau distillée saturée en NaCl. la phase organique est décantée, séchée sur sulfate de magnésium, filtrée, puis concentrée à sec sous pression réduite pour donner 16,2g d'un produit qui est purifié par chromatographie flash (dichlorométhane, MeOH 90/10). On obtient ainsi 4,59g d'un produit qui est 10 recristallisé dans 45ml de cyclohexane pour donner 3,44g de 4-éthyl isopropyl aminobenzyl acétamido malonate de diéthyle sous forme de cristaux blancs fondants à 80°C.

15 39-3: 4-Ethylaminobenzylacétamido malonate de diéthyle

Le 4-éthyl aminobenzylacétamido malonate de diéthyle peut être préparé en opérant comme à l'exemple 35-7 mais à partir de 22 g de 4-aminobenzyl acétamidomalonate de diéthyle, 500 ml d'éthanol et 70 g de nickel de raney. On obtient ainsi, 23,8 g de 4-éthylamino benzylacétamido malonate de diéthyle sous 20 forme d'un solide blanc cassé fondant à 136°C.

25 39-4: 4-Allyl éthylaminophénylalanine (RS), dichlorhydrate

En opérant comme à l'exemple 35-1 mais à partir de 4,54 g de 4-allyl éthylbenzyl acétamido malonate de diéthyle et de 37,9 ml d'acide chlorhydrique à 10N, on obtient après évaporation un solide qui est séché sous pression réduite (2,7 kPa) à 40°C. On obtient 3,67g de dichlorhydrate de 4-allyl éthylaminophénylalanine 30 (RS) sous forme d'un solide brun fondant vers 130°C (décomposition).

.39-5: 4-Allyl éthylaminobenzyl acétamido malonate de diéthyle

35 En opérant comme à l'exemple 39-2 mais à partir de 8 g de 4-éthylaminobenzylacétamido malonate de diéthyle, 4 ml de bromure d'allyle, 5,82 ml de 1,5-diazabicyclo[4.3.0]non-5-ène, dans 50ml de THF, on obtient après

purification par chromatographie flash (éluant CH₂Cl₂ / AcOEt 90-10 en volume) 5, 6g d'un solide qui est recristallisé dans 35ml de cyclohexane. On obtient ainsi 5,43g de 4-allyl éthylaminobenzyl acétamido malonate de diéthyle sous forme d'un solide blanc fondant à 86°C.

5

39-6: 4-Ethyl propylaminophénylalanine (RS), dichlorhydrate

En opérant comme à l'exemple 35-1 mais à partir de 2,5 g de 4-éthyl propylaminobenzyl acétamido malonate de diéthyle et de 21 ml d'acide chlorhydrique à 10N, on obtient après évaporation un solide qui est séché sous pression réduite (2,7 kPa) à 40°C. On obtient 2 g (97%) de dichlorhydrate de 4-éthyl propylaminophénylalanine (RS) sous forme d'un solide blanc fondant vers 147°C (décomposition).

15

39-7: 4-Ethyl propylaminobenzyl acétamido malonate de diéthyle

En opérant comme à l'exemple 39-2 mais à partir de 10 g de 4-éthylaminobenzylacétamido malonate de diéthyle, 5,6 ml de 1-iodo propane, 7,2 ml de 1,5-diazabicyclo[4.3.0]non-5-ène, dans 70ml de THF, on obtient après 36heures de réaction puis purification par chromatographie flash (éluant CH₂Cl₂ / MeOH 97-3 en volume), 2,8g d'un solide qui est recristallisé dans 26 ml de cyclohexane. On obtient ainsi 2,9g de 4-éthyl propylaminobenzyl acétamido malonate de diéthyle sous forme d'un solide blanc fondant à 84-86°C.

25

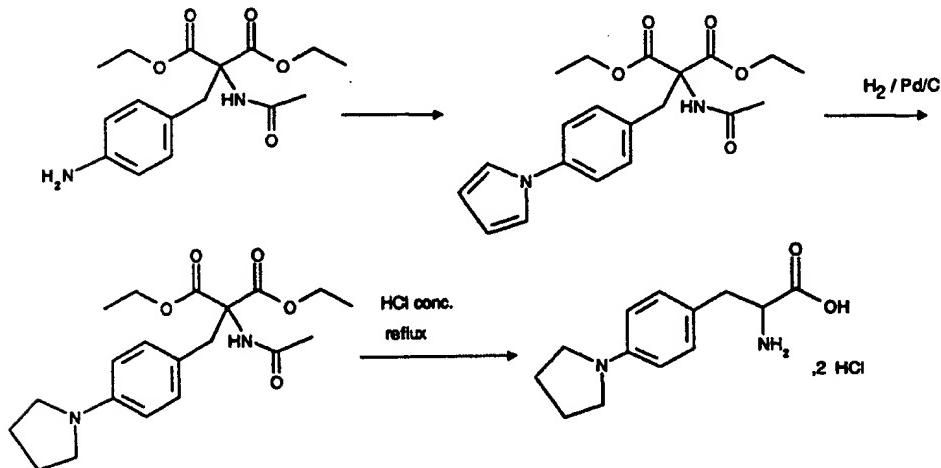
39-8: 4-Ethyl méthylcyclopropylaminophénylalanine (RS) dichlorhydrate

En opérant comme à l'exemple 35-1 mais à partir de 3 g de 4-éthyl méthylcyclopropylaminobenzyl acétamido malonate de diéthyle et de 25 ml d'acide chlorhydrique 10N, on obtient après 3 jours de réaction, puis évaporation un solide qui est trittré dans 40 ml d'acétone, filtré puis séché sous pression réduite (2,7 kPa) à 40°C. On obtient 2,24 g de dichlorhydrate de 4-éthyl méthylcyclopropylaminophénylalanine (RS) sous forme d'un solide blanc fondant vers 140°C (décomposition).

39-9: 4-Ethyl méthylcyclopropylaminobenzyl acétamido malonate de diéthyle

5 En opérant comme à l'exemple 39-2 mais à partir de 8 g de 4-éthylaminobenzylacétamido malonate de diéthyle, 2,6 ml de bromométhylcyclopropane, 2,97 ml de 1,5-diazabicyclo[4.3.0]non-5-ène, dans 50ml de THF, on obtient après 3 jours de réaction puis purification par chromatographie flash (éluant CH₂Cl₂ / AcOEt 90-10 en volume), 3,3 g de 4-éthyl
10 méthylcyclopropylaminobenzyl acétamido malonate de diéthyle sous forme d'un solide blanc fondant à 112-114°C.

15

EXEMPLE 40: Préparation de dérivés de phénylalanine par la méthode G

20

40-1: 4-(1-pyrrolidinyl) phénylalanine (RS) dichlorhydrate

En opérant comme à l'exemple 35-1 mais à partir de 1,5 g de 4-(1-pyrrolidinyl) benzyl acétamidomalonate de diéthyle et de 40 ml d'acide chlorhydrique 5N, on obtient après évaporation un solide qui est trituré dans 15 ml d'acétone, filtré puis

séché sous pression réduite (2,7 kPa) à 40°C. On obtient 0,6 g de dichlorhydrate de 4-(1-pyrrolidinyl) phénylalanine (RS) sous forme d'un solide blanc cassé.

5 40-2: 4-(1-pyrrolidinyl) benzyl acétamidomalonate de diéthyle

On place dans un autoclave 4g de 4-(1-pyrrolyl) benzyl acétamidomalonate de diéthyle en solution dans 100ml de MeOH et 1g de palladium sur charbon à 10%. Après avoir purgé 3 fois à l'azote, le produit est hydrogéné sous une pression de 14 bars d'hydrogène à 19°C. Après 25 heures d'agitation, l'hydrogénéation est arrêtée, le produit filtré sur Clarcel®, rincé au dichlorométhane puis la solution concentrée sous pression réduite pour donner 3,85 g d'un solide qui est trituré dans un mélange de 50ml d'heptane et de 10 ml d'éther éthylique. Le solide obtenu est filtré, séché puis purifié par chromatographie flash (éluant CH₂Cl₂ / acétone 90/10 en volume) pour donner 1,6g de 4-(1-pyrrolidinyl) benzyl acétamidomalonate de diéthyle sous forme d'un solide blanc fondant à 132°C

40-3: 4-(1-pyrrolyl) benzyl acétamidomalonate de diéthyle

20 On place dans un tricol maintenu sous azote, 4,6 g de 4-aminobenzyl acétamidomalonate de diéthyle dans 104 ml d'acide acétique. On ajoute 7,02 g d'acétate de sodium puis 1,87 ml de 2,5-diméthoxytétrahydrofurane. Le mélange est chauffé à 65°C pendant 1h 15mn, refroidi, puis extrait par 100ml de dichlorométhane et 100ml d'eau distillée. La phase aqueuse est décantée puis lavée par 3 fois 100 ml de dichlorométhane. Les phases organiques sont réunies, lavées par 100 ml d'eau puis par 100 ml d'une solution saturée en NaCl, décantées puis séchées sur sulfate de magnésium, filtrées puis évaporées à sec sous pression réduite(50k Pa) pour donner 6,2g d'un solide qui est purifié par chromatographie flash (éluant CH₂Cl₂ / acétone 75/25 en volume). On obtient ainsi 3,57 g de 4-(1-pyrrolyl) benzyl acétamidomalonate de diéthyle sous forme d'un solide beige fondant à 110°C.

EXAMPLE 41: Préparation de dérivés de phénylalanine par la méthode H

35 41-1: 4-Ethylthiométhyl phénylalanine (RS)

On place dans un tricol maintenu sous azote, 300ml de méthanol anhydre puis on ajoute sous agitation 1, 72g de méthylate de sodium puis 5,55ml d'éthyl mercaptan. Le solvant est concentré sous pression réduite à 40°C pour donner 8,5 g
5 du sel de sodium de l'éthylmercaptan qui est mis en solution dans 100ml de THF anhydre. On ajoute à température ambiante 3,6g de 4-chlorométhyl phénylalanine (RS) puis le mélange est chauffé au reflux pendant 18h. Le solvant est évaporé sous pression réduite à 40°C et le résidu repris par 100ml d'eau distillée. La solution trouble obtenue est acidifiée par 5 ml d'acide acétique. Le précipité obtenu est filtré,
10 rincé à l'eau distillée puis séché à 60°C sous pression réduite pour donner 3,6g d'un solide qui est purifié par chromatographie flash (éluant AcOEt 60, AcOH 12, eau 10). On obtient ainsi 256 mg de 4-éthylthiométhyl phénylalanine (RS), sous forme d'un solide blanc fondant à 251°C.
La 4-chlorométhyl phénylalanine (RS) peut être obtenue par analogie avec la 4-chlorométhyl phénylalanine (S) décrite dans : R.Gonzalez-Muniz, F. Cornille, F. Bergeron, D. Ficheux, J. Pothier, C. Durieux and B. Roques, Int. J. Pept. Protein. Res., 1991, 37 (41), 331-340.

EXEMPLE 42: Préparation de dérivés de phénylalanine par la méthode I

42-1:4-O-(2-Chloroéthyl) tyrosine (S), chlorhydrate

On place dans un ballon, 5g de N-tert-butoxy carbonyl-4-O-(2-chloroéthyl) tyrosine (S) en solution dans 50ml de dioxane chlorhydrique. Après 28h d'agitation, 25 le mélange est concentré à sec sous pression réduite. Le résidu obtenu est repris par 50ml d'éther, agité puis filtré. Le solide obtenu est lavé par 2 fois 25 ml d'éther, séché sous pression réduite pour donner 1,58g de chlorhydrate de 4-O-(2-chloroéthyl) tyrosine (S) sous forme d'un solide blanc fondant à 260°C.

42-2: N-tert-butoxy carbonyl-4-O-(2-chloroéthyl) tyrosine (S)

On place dans un tricol sous atmosphère d'azote, 14g de N-tert-butoxycarbonyl tyrosine (S), en solution dans 140ml de DMF. On ajoute 4,8g d'hydrure de sodium à 35 50% dans l'huile lentement à la spatule. Après 2h d'agitation à température ambiante,

on ajoute 16,87g de 1-tosyl 2-chloroéthanol . Après 2 jours d'agitation on ajoute 2,4g
d'hydrure de sodium à 50% dans l'huile et 8,4ml supplémentaires de 1-tosyl 2-
chloroéthanol . La même opération est effectuée après 24h et l'agitation est
poursuivie 24h supplémentaires. La réaction est arrêtée par addition de 100ml d'eau
5 distillée et le mélange réactionnel est concentré à sec sous pression réduite. Le résidu
obtenu est repris par 100ml d'eau distillée puis extrait par 3 fois 100ml d'acétate
d'éthyle. La phase aqueuse est décantée, acidifiée par 50ml d'HCl 1N jusqu'à pH3 et
le produit est extrait par 3 fois 100ml d'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont
réunies, lavées par 2 fois 50ml d'eau, décantées , séchées sur sulfate de magnésium,
10 filtrées puis concentrées à sec sous pression réduite pour donner 13,51g de N-tert-
butoxy carbonyl-4-O-(2-chloroéthyl) tyrosine (S) sous forme d'une huile marron (Rf
0,5, toluène 70% / méthanol 20% / diéthylamine 10%) utilisée telle quelle dans
l'étape suivante.

TABLEAU V

MICROORGANISMES	ANTIBIOTIQUES
CHAMPIGNONS	
<u>Micromonospora</u> sp.	Vernamycines
STREPTOMYCES	
<u>S. alborectus</u>	Virginiamycines
<u>S. conganensis</u> (ATCC13528)	F1370 A, B
<u>S. diastaticus</u>	Plauracines, Streptogramines
<u>S. graminofasciens</u>	Streptogramines
<u>S. griseus</u> (NRRL2426)	Viridogriséine (Etamycine)
<u>S. griseoviridus</u>	Griseoviridine
<u>S. griseoviridus</u> (FERMP3562)	Néoviridogriséines
<u>S. lavendulae</u>	Etamycines
<u>S. loïensis</u> (ATCC11415)	Vernamycines
<u>S. mitakaensis</u> (ATCC15297)	Mikamycines
<u>S. olivaceus</u> (ATCC12019)	Synergistines (PA114 A, B)
<u>S. ostréogriseus</u> (ATCC27455)	Ostréogrycines
<u>S. pristinaespiralis</u> (ATCC25486)	Pristinamycines
<u>S. virginiae</u> (ATCC13161)	Virginiamycines (Staphylomycines)
ACTINOMYCETES	
<u>A. auranticolor</u> (ATCC31011)	Plauracines
<u>A. azureus</u> (ATCC31157)	Plauracines
<u>A. daghestanicus</u>	Etamycine
<u>A. philippinensis</u>	A-2315 A, B, C
<u>Actinoplanes</u> sp. (ATCC33002)	A15104
<u>Actinoplanes</u> sp.	A17002 A, B, C, F
<u>Actinomadura flava</u>	Madumycines

Abréviations utilisées :

	AcOEt	acétate d'éthyle
	ADN :	acide déoxyribonucléique
5	AMP :	adénosine 5'-monophosphate
	CH ₂ Cl ₂ :	dichlorométhane
	CLHP :	chromatographie liquide haute performance
	dCTP	déoxy-cytosine 5'-triphosphate
	DMF	diméthylformamide
10	DMPAPA	4-diméthylamino-L-phénylalanine
	HCl	acide chlorhydrique
	HT7	Hickey Tresner solid medium
	3-HPA	acide 3-hydroxypicolinique
	IPTG	isopropyl β-D-thiogalactopyranoside
15	kb:	kilobase
	LB:	Luria broth (milieu de croissance riche pour <i>E. coli</i>)
	MeOH	méthanol
	MMPAPA	4-méthylamino-L-phénylalanine
	NaOH	hydroxyde de sodium
20	PAPA	4-amino-L-phénylalanine
	PEG	Polyéthylène glycol
	P I	Pristinamycine I
	P II	Pristinamycine II
	pb :	paire de base
25	SAM:	S-adénosylméthionine
	TE :	tampon 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,5
	THF	tétrahydrofurane
	Tris:	amino-2-hydroxyméthyl-2 propanediol-1,3
	U.V.:	rayons ultra-violets
30	X-gal:	5-bromo-4-chloro-3-indoyl-β-D-galactoside
	YEME:	yeast extract-malt extract medium (milieu de croissance riche pour <i>Streptomyces</i>)

Bibliographie:

- Bibb M. J., Findlay P. R. et Johnson M. W. (1984) *Gene*, 30 : 157-166.
- Bibb M. J., Janssen G. R., et Ward J. M. (1985) *Gene*, 38 : 215-226.
- 5 - Cocito C. G. (1979) *Microbiol. Rev.*, 43 : 145-198.
- Cocito C. G. (1983) In *Antibiotics*, 6 : (Ed. F. E. Hahn), 296-332.
- Dessen P. C., Fontrat C., Valencien C. et Mugnier C. (1990) *Comp. Appl. in Biosciences*, 6 : 355-356.
- Di Giambattista M., Chinali G. et Cocito C. G. (1989) *J. Antim. Chemother.*, 24 :
- 10 1485-507.
- Gibson T.J. (1984) *Ph.D. thesis*, Cambridge University, England.
- Hillemann D., Pülher A. et Wohlleben W. (1991) *Nucl. Acids Res.*, 19 : 727-731.
- Hopwood D. A., Bibb M. J., Chater K. F., Kieser T., Bruton C. J., Kieser H. M., Lydiate D. J., Smith C. P., Ward J. M. et Scrempt H. (1985) *A laboratory manual.*,
- 15 The John Innes Fondation, Norwich, England.
- Hudson G. S. et Davidson B. E. (1984) *J. Mol. Biol.*, 180 : 1023-1051.
- Kuhstoss S., Richardson M. A., et Rao R. N. (1991) *Gene* 97 : 143-146.
- Maniatis T., Fritsch E. F. et Sambrook J. (1989) *Molecular cloning : a laboratory manual. Cold Spring Harbor, N. Y.*,
- 20 - Messing J., Crea R. et Seeburg P. H. (1981) *Nucleic Acids Res.*, 9 : 309.
- Molinero A. A., Kingston D. G. I., et Reed J. W. (1989) *J. Nat. Prod.*, 52 : 99-108.
- Omer C. A., Lenstra R., Little P. J., Dean J., Tepperman J. M., Leto K. J., Romesser J. A., et O'Keefe D. P. (1990) *J. Bact.* 172 : 3335-3345.
- 25 - Reed J. W., Purvis M. B., Kingston D. G. I., Biot A., et Gosselé F. (1989) *J. Org. Chem.* 54 : 1161-1165.
- Staden R. et McLachlan A. D. (1982) *Nucleic Acids Res.*, 10 : 141-156.
- Schindler U., Sans N., et Schröder J. (1989) *J. Bact.* 171 : 847-854.
- Thorson J. S.; Lo S. F., et Liu H-W. (1993) *J. Am. Chem. Soc.* 115 : 6993-6994.
- 30 - Videau D. (1982) *Path. Biol.*, 30 : 529-534.

LISTE DE SEQUENCES

(1) INFORMATION GENERALE:

5 (i) DEPOSANT:
 (A) NOM: RHONE-POULENC RORER S.A.
 (B) RUE: 20, avenue Raymond ARON
 (C) VILLE: ANTONY
 (E) PAYS: FRANCE
 (F) CODE POSTAL: 92165
 10 (ii) TITRE DE L' INVENTION : NOUVELLES STREPTOGRAMINES ET PROCEDE
 DE PREPARATION DE STREPTOGRAMINES PAR MUTASYNTHÈSE.

15 (iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 8
 (iv) FORME LISIBLE PAR ORDINATEUR:
 (A) TYPE DE SUPPORT: Tape
 (B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
 (C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
 (D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (OEB)

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 1:

20 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 2888 paires de bases
 (B) TYPE: acide nucléique
 (C) NOMBRE DE BRINS: double
 (D) CONFIGURATION: linéaire
 25 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC
 (iii) HYPOTHETIQUE: NON
 (iii) ANTI-SENS: NON
 (vi) ORIGINE:
 (A) ORGANISME: Streptomyces pristinaespiralis

30 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

35	10	20	30	40	50	60
	CTGCAGTTCC	CCGGGGCCAC	CGTGCTCAGC	TCCTCACCCG	AACGGTTCCT	GCGCATCGGC
	70	80	90	100	110	120
	GCGGACGGCT	GGGCCGGAGTC	CAAACCCATC	AAGGGCACCC	GCCCCCGCGG	CGCCGGCCCC
40	130	140	150	160	170	180
	GCCCAGGACG	CCGCCGTCAA	GGCCTCCCTC	GCCGCCGGCCG	AGAAGGACCG	CAGCGAGAAC
	190	200	210	220	230	240
	CTGATGATCG	TCGACCTGGT	CCGCAACGAC	CTCGGCCAGG	TCTGGACAT	CGGCTCCGTC
45	250	260	270	280	290	300
	CACGTACCGG	GCCTGTTCGA	GGTGGAGACC	TACGCCACCG	TCCACCAGCT	CGTCAGCACG
50	310	320	330	340	350	360
	GTCCGGGGCC	GCCTGGCGGC	CGACGTCTCC	CGCCCCCGCG	CGGTACGGGC	CGCCTTCCCC

	370	380	390	400	410	420
	GGCGGGTCGA	TGACCGGC	GCCCAGGTC	CGCACCATGC	AGTTCATCGA	CCGGCTCGAG
5	430	440	450	460	470	480
	AAGGGCCCGC	GCGCGTGT	CTCGGGCG	CTGGGCTACT	TCGCCCTCA	CGGCGCGGCC
	490	500	510	520	530	540
	GACCTCAGCA	TCGTCATCCG	CACCATCGTC	GCCACCGAGG	AGGCCGCCAC	CATCGGCGTG
10	550	560	570	580	590	600
	GGCGGCCGCG	TCGTCGCCCT	GTCCGACCCC	GACGACGAGG	TCCGGAAAT	GCTCCTCAAG
	610	620	630	640	650	660
15	GCGCAGACCA	CCCTCGCCGC	CCTCGGCCAG	GCACACGCGG	GCGCCACCGC	CTCGGACCGT
	670	680	690	700	710	720
	GAACTCCTGG	CCGGCAGCCT	CGGGTGACCC	ACCCACCGCC	CCACCCGGC	CACCGCAACC
20	730	740	750	760	770	780
	CCGGCTCAC	CCCCGGCGG	CCGCGCGCG	TGCCGCCCG	CGGCCGACCC	GGCGACGGGT
	790	800	810	820	830	840
	CCGCTCGCGG	ACCGGGTGAC	GGACCCGGCG	GGGGGCCCG	CGGGGGCCCG	GGACGTGGGC
25	850	860	870	880	890	900
	CGGGACGTGG	CCCCGGCGTC	CCC GGCGACC	GGCACGGCGG	CGGGCCCGGA	CGTGGGCCCCG
	910	920	930	940	950	960
30	GCGTGCCCGG	CGACCGGCAC	GGTGGCGGGG	CGGGGCGGGG	GACGGTCAGT	GCAGGGCGGT
	970	980	990	1000	1010	1020
	GAACATCCGC	GCGCACAGCC	GTTCCAGCTC	CGCGCCGTGC	TCGCCCAGCA	CACCGCGCAG
35	1030	1040	1050	1060	1070	1080
	TTCGGCGAAC	AGGGCGCGA	ACGTCTCCCTC	GTCGCCCTC	TCGACGGCCT	GCCCCAGCCG
	1090	1100	1110	1120	1130	1140
	CACCAAGGCCG	CGGCCCAGCG	CCTGCCGCGC	GGCCGGCGCG	CGGGGTTGG	CGGCCTGGAT
40	1150	1160	1170	1180	1190	1200
	GTCGAAATAAC	ACCTCCGGCG	TCCCAGCGGC	GATCCGGGCC	AGCAGCGCCA	GCATCGCCAG
	1210	1220	1230	1240	1250	1260
45	ATGCGCGGCG	GGGGCACTGT	CCCGCAGCGC	CCCCACGTCC	ACCGACAGCT	CACCCAGGCC
	1270	1280	1290	1300	1310	1320
	CAGCCCGAAG	GCCAGCACCG	CGGCATGCGT	GGCGGCCCTGC	TGCGCGCGG	TCAGCTCGTC
50	1330	1340	1350	1360	1370	1380
	GTGCCGCCGC	GCCCCATCT	CCACCAACCG	GGCCCCCCAC	CCGGCCACCA	GCTCCACCAAG
	1390	1400	1410	1420	1430	1440
	GGCCCCGACA	CGGGCCCGT	CGGTGACCAC	CACCGCCGCC	ACCGGCCGCC	CCTGAAGACC
55	1450	1460	1470	1480	1490	1500
	CAGCGAGGGGG	GCGAACATCG	GGTTCAGCCC	CACCGCCTGC	AGCCCCGGCG	CCGCCTCACG
	1510	1520	1530	1540	1550	1560
60	CAGCCGCCCG	GCGATCCGGC	TCTTGACCGA	CAAGGTGTCC	GCGAGCACCG	CACCGGGCCG
	1570	1580	1590	1600	1610	1620
	CATCACCCCC	GCCAGCACCT	CCACCGCCCTC	CCACGCCACC	GGCTCCGGCA	CCGCCAGCAC
65	1630	1640	1650	1660	1670	1680
	CACCAAGTCC	GGCGCCGCCA	GCGCCGCGAC	CGCCCTCCGGC	CCCGGCCGCC	GCACATCAC
	1690	1700	1710	1720	1730	1740

GGCCACCAACC CGCACCCCGT CCGCCGCACC GGCCCCGGCC ACGTCCAGCC AGGTCAACCGC
 1750 1760 1770 1780 1790 1800
 CACCCCCGAA CGCACCAAGCC AGTGGCTGAA CATGCGGCC ACCGCACCGG CCCCGCCCAC
 5
 1810 1820 1830 1840 1850 1860
 CACCAACACAA CGCCCGAACCA CGGAACCACC CCTCATCCGC GTTCCCGATC CCCCCGGTAC
 10
 1870 1880 1890 1900 1910 1920
 GGAGGAAGAA CCATGACCCC GCCCCGCCATC CCCGCCGCC CGCCCGCCAC CGGGCCCCGCC
 1930 1940 1950 1960 1970 1980
 CCCGCCACCG ACCCCCTCGA CGCGCTGCGC GCCCCGCTGG ACGCCGCGGA CGCCGCCCTG
 15
 1990 2000 2010 2020 2030 2040
 CTGGACGCCG TCCGCACACG CCTGGACATC TGCGCTGCGA TCGGGAGTA CAAGCGCCTC
 2050 2060 2070 2080 2090 2100
 CACCAAGGTGC CGATGATGCA GCCCCACCGG ATCGCCCAAGG TCCACGCCAA CGCCGCCCGC
 20
 2110 2120 2130 2140 2150 2160
 TACGCCGCCG ACCACGGCAT CGACCCCGCC TTCCCTGCGCA CCCTGTACGA CACGATCATC
 2170 2180 2190 2200 2210 2220
 25 ACCGAGACCT GCCGCCTCGA GGACGAGTGG ATCGCCTCCG GCGGCGCCCC CGTCCCCACG
 2230 2240 2250 2260 2270 2280
 CCCGTGCACG CGTCCCGCGTC CGCGCGGGGG GCGGTGTCGT GACCGCCGCC GCACCCACCC
 30
 2290 2300 2310 2320 2330 2340
 TCGCCCCAGGC GCTGGACGAG GCCACCGGGC AGCTGACCGG CGCCGGGATC ACCGCGACG
 2350 2360 2370 2380 2390 2400
 CCGCCCCGGGC CGACACCCGG CTGCTGGCGC CCCACGCTCG CCAGGTCGCC CGGGGGGACC
 35
 2410 2420 2430 2440 2450 2460
 TCGACACCTG CCTGGCCGGC CCGGTGCCGC CCCGGTTCTG GCACTACCTC CGGCGCCGTC
 2470 2480 2490 2500 2510 2520
 40 TGACCCCGCA ACCCGCCGAA CGCATCGTCG GCCACGCCA CTTCATGGC CACCGCTTCG
 2530 2540 2550 2560 2570 2580
 ACCTGGCCCC CGGCGTCTTC GTCCCCAAAC CCGAGACCGA GGAGATCACC CGGGACGCCA
 45
 2590 2600 2610 2620 2630 2640
 TCGCCCCGCCT GGAGGCCCTC GTCCGCCCGC GCACCAACCG ACCCCTGGTC GTCGACCTGT
 2650 2660 2670 2680 2690 2700
 50 GCGCCGGACC GGGCACCATG CGCGTCACCC TGGCCCGCCA CGTACCGGCC GCGCGCGTCC
 2710 2720 2730 2740 2750 2760
 TGGGCATCGA ACTCTCCCAAG CGCGCCGCC GCGCCGCCCG GCGCAACGCC CGCGGCCACCG
 2770 2780 2790 2800 2810 2820
 55 GCGCCCCGCAT CGTGCAGGGC GACGCCCGCG ACGCCTTCCC CGAACTGAGC GGCACCGTCG
 2830 2840 2850 2860 2870 2880
 ACCTCGTCGT CACCAACCCG CCCTACATCC CCATCGGACT GCGCACCTCC GCACCCGAAG
 60
 TGCTCGAG

(3) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 2:

	(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:	
	(A) LONGUEUR: 888 paires de bases	
5	(B) TYPE: acide nucléique	
	(C) NOMBRE DE BRINS: double	
	(D) CONFIGURATION: linéaire	
	(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC	
	(iii) HYPOTHETIQUE: NON	
	(iv) ANTI-SENS: NON	
10	(vi) ORIGINE:	
	(A) ORGANISME: Streptomyces pristinaespiralis	
	(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2	
15		
	ATG AGG GGT GGT TCG GTG TTC GGG CGT TGT GTG GTG GGC GGG GCC GGT GCG Met Arg Gly Gly Ser Val Phe Gly Arg Cys Val Val Val Gly Ala Gly Ala	54 18
20	GTG GGC CGC ATG TTC AGC CAC TGG CTG GTG CGT TCG GGG GTG GCG GTG ACC TGG Val Gly Arg Met Phe Ser His Trp Leu Val Arg Ser Gly Val Ala Val Thr Trp	108 36
25	CTG GAC GTG GCC GGG GGT GCG GCG GAC GGG GTG CGG GTG GTG GCC GGT GAT Leu Asp Val Ala Gly Ala Ala Asp Gly Val Arg Val Val Ala Gly Asp	162 54
30	GTG CGG CGG CCG GGG CCG GAG GCG GTC GCG GCG CTG GCG GCG GCG GAC GTG GTG Val Arg Arg Pro Gly Pro Glu Ala Val Ala Ala Leu Ala Ala Asp Val Val	216 72
35	GTG CTG GCG GTG CCG GAG CCG GTG GCG TGG GAG GCG GTG GAG GTG CTG CGC GGG Val Leu Ala Val Pro Glu Pro Val Ala Trp Glu Ala Val Glu Val Leu Ala Gly	270 90
40	GTG ATG CGG CCC GGT GCG GTG CTC GCG GAC ACC TTG TCG GTC AAG AGC CGG ATC Val Met Arg Pro Gly Ala Val Leu Ala Asp Thr Leu Ser Val Lys Ser Arg Ile	324 108
45	GCC GGG CGG CTG CGT GAG GCG GCG CCG GGG CTG CAG GCG GTG GGG CTG AAC CCG Ala Gly Arg Leu Arg Glu Ala Ala Pro Gly Leu Gln Ala Val Gly Leu Asn Pro	378 126
50	ATG TTC GCC CCC TCG CTG GGT CTT CAG GGG CGG CCG GTG GCG GCG GTG GTG GTC Met Phe Ala Pro Ser Leu Gly Leu Gln Gly Arg Pro Val Ala Ala Val Val Val	432 144
55	ACC GAC GGG CCC GGT GTG CGG GCC CTG GTG GAG CTG GTG GCC GGG TGG GGG GCC Thr Asp Gly Pro Gly Val Arg Ala Leu Val Glu Leu Val Ala Gly Trp Gly Ala	486 162
	CGG GTG GTG GAG ATG CCG GCG CGG CGG CAC GAC GAG CTG ACC GCC GCG CAG CAG Arg Val Val Glu Met Pro Ala Arg Arg His Asp Glu Leu Thr Ala Ala Gln Gln	540 180
	GCC GCC ACG CAT GCC GCG GTG CTG GCC TTC GGG CTG GGC CTG GGT GAG CTG TCG Ala Ala Thr His Ala Ala Val Leu Ala Phe Gly Leu Gly Leu Gly Glu Leu Ser	594 198

	GTC GAC GTG GGG GCG CTG CGG GAC AGT GCC CCG CCG CCG CAT CTG GCG ATG CTG Val Asp Val Gly Ala Leu Arg Asp Ser Ala Pro Pro Pro His Leu Ala Met Leu	648 216
5	GCG CTG CTG GCC CGG ATC GCC GGC GGG ACG CCG GAG GTG TAT TTC GAC ATC CAG Ala Leu Leu Ala Arg Ile Ala Gly Gly Thr Pro Glu Val Tyr Phe Asp Ile Gln	702 234
10	GCC GCC AAC CCC GGC GCG CCG GCC GCG CAG GCG CTG GGC CGC GGC CTG GTG Ala Ala Asn Pro Gly Ala Pro Ala Arg Gln Ala Leu Gly Arg Gly Leu Val	756 252
15	CGG CTG GGG CAG GCC GTC GAG AGG GGC GAC GAG ACG TTC GCC GCC CTG TTC Arg Leu Gly Gln Ala Val Glu Arg Gly Asp Glu Glu Thr Phe Ala Ala Leu Phe	810 270
20	GCC GAA CTG CGC GGT GTG CTG GGC GAG CAC GGC GCG GAG CTG GAA CGG CTG TGC Ala Glu Leu Arg Gly Val Leu Gly Glu His Gly Ala Glu Leu Glu Arg Leu Cys	864 288
	GCG CGG ATG TTC ACC GCC CTG CAC Ala Arg Met Phe Thr Ala Leu His	888 296
25		

(4) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 3:

30	(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE: (A) LONGUEUR: 387 paires de bases (B) TYPE: acide nucléique (C) NOMBRE DE BRINS: double (D) CONFIGURATION: linéaire	
35	(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC (iii) HYPOTHETIQUE: NON (iv) ANTI-SENS: NON (vi) ORIGINE: (A) ORGANISME: Streptomyces pristinaespiralis	
40	(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3	
45	ATG ACC CCG CCC GCC ATC CCC GCC GCG CCG CCC GCC ACC GGG CCC GCC CCC GCC Met Thr Pro Pro Ala Ile Pro Ala Ala Pro Pro Ala Thr Gly Pro Ala Ala Ala	54 18
50	ACC GAC CCC CTC GAC GCG CTG CGC GCC CGC CTG GAC GCC GCG GAC GCC GCC CTG Thr Asp Pro Leu Asp Ala Leu Arg Ala Arg Leu Asp Ala Ala Asp Ala Ala Leu	108 36
55	CTG GAC GCC GTC CGC ACA CGC CTG GAC ATC TGC CTG CGC ATC GGC GAG TAC AAG Leu Asp Ala Val Arg Thr Arg Leu Asp Ile Cys Leu Arg Ile Gly Glu Tyr Lys	162 54
	CGC CTC CAC CAG GTG CCG ATG ATG CAG CCC CAC CGG ATC GCC CAG GTC CAC GCC Arg Leu His Gln Val Pro Met Met Gln Pro His Arg Ile Ala Gln Val His Ala	216 72

	AAC GCC GCC CGC TAC GCC GAC CAC GGC ATC GAC CCC GCC TTC CTG CGC ACC	270
5	Asn Ala Ala Arg Tyr Ala Ala Asp His Gly Ile Asp Pro Ala Phe Leu Arg Thr	90
	CTG TAC GAC ACG ATC ATC ACC GAG ACC TGC CGC CTC GAG GAC GAG TGG ATC GCC	324
	Leu Tyr Asp Thr Ile Ile Thr Glu Thr Cys Arg Leu Glu Asp Glu Trp Ile Ala	108
10	TCC GGC GGC GCC CCC GTC CCC ACG CCC GTG CAC GCG TCC GCG TCC GCG CGG GGG	378
	Ser Gly Gly Ala Pro Val Pro Thr Pro Val His Ala Ser Ala Ser Ala Arg Gly	126
15	GCC GTG TCG	387
	Ala Val Ser	129

20

(5) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 4:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 25 (A) LONGUEUR: 4496 paires de bases
 (B) TYPE: acide nucléique
 (C) NOMBRE DE BRINS: double
 (D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC
- (iii) HYPOTHETIQUE: NON
- 30 (iv) ANTI-SENS: NON
- (v) ORIGINE:
 (A) ORGANISME: Streptomyces pristinaespiralis
- 35 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4

40	10	20	30	40	50	60
	CTCGAGCAGG	TGCCAACCT	CGGGGGCACG	GTGCGCGGGC	AGCGCGAAC	CCGGCAGCGC
	70	80	90	100	110	120
45	GCCCAGACGG	AACAGCGCGA	AGCACACCGC	GACGAACCTCG	GGCGTGTTCG	GCAGCTGCAC
	130	140	150	160	170	180
	CAGCACCCGC	TGCGCGCGC	CGATCCCGCG	CGCCGCGAAC	CCCGCCGCCA	CCGGTGCAG
50	190	200	210	220	230	240
	CCAGCGGTCC	AGGGCACGGT	AGGTGACACG	GGAGCACCCG	TCCGCGCCGA	CCAGCGCCTC
	250	260	270	280	290	300
	CCGCTCGCCG	TACTGCTCCG	CCCAGCGGCC	CAGCAGCATG	CCCAGCGGCT	CGCCCCGCCA
55	310	320	330	340	350	360
	GTAGCCGGCC	GCCCCGTACT	TCGCGGCCAC	ATCCTCGGGC	CAGGGAACGC	ATCCGTCCAG
	370	380	390	400	410	420

CATCGTTGGT CCTTTCCGGC TTCGTCTCG CGTCGCCCC AGTGTGGCA GCGCCGTTGA
 430 440 450 460 470 480
 CACGCCGCTG ATGCGCCGCG CCCGCCGCC GCCGCTCCGT CAGGAGCCGA TCAGGGCGGC
 5 490 500 510 520 530 540
 GTCAGCCGGG CCGGACAGGA TGCCGCCAC GGGGCCGGC ACACCGGGC GCGGCCGACAG
 10 550 560 570 580 590 600
 CGGGCCGGCG ACCGGCAGGC CGACACCAGC CACGGACGAG AAGAAACAAC ACAAGGGGAG
 610 620 630 640 650 660
 CACCCGATGG AGACCTGGGT CCTGGGCCGG CGCGACGTCG CCGAGGTGGT GGCGGCCGTC
 15 670 680 690 700 710 720
 GCGCGGACG AACTCATGCG CCGCATCATC GACCGCTCA CGGGCGGACT GGCGGAGATC
 730 740 750 760 770 780
 GGCGCGGGCG AGCGGCACCT GTCCCCGCTG CGCGGCGGAC TGGAACGAG CGAACCCGTG
 20 790 800 810 820 830 840
 CCCGGCATCT GGGATGGAT GCCGCACCGC GAACCCGGCG ACCACATCAC CCTCAAGACC
 850 860 870 880 890 900
 25 GTCGGCTACA GCCCGGCCAA CCCCGGCCGC TTCGGCCTGC CGACCATCCT GGGCACCGTC
 910 920 930 940 950 960
 GCGCGCTACG ACGACACCAC CGGCGCCCTG ACCGCCCCTGA TGGACGGCGT GCTGCTCAC
 30 970 980 990 1000 1010 1020
 GCGCTGGCA CGGGCGCCGC CTCCGCCGTC GCCTCCCCGC TGCTGGCCCG CCCCGACAGC
 1030 1040 1050 1060 1070 1080
 35 CACACCTGG GACTGATCGG CACCGGCGCC CAGGCCGTCA CCCAAGTGCA CGCCCTGTCC
 1090 1100 1110 1120 1130 1140
 CTGGTACTGC CCCTGCAACG GGCCCTGGTG TGGGACACCG ACCCCGCCA CGGGAAAGC
 1150 1160 1170 1180 1190 1200
 40 TTTCGCCCCGGC GCGCCGCGTT CACCGGCGTC AGCGTCGAGA TCGCCGAGCC CGCCCGGATC
 1210 1220 1230 1240 1250 1260
 GCCGCCGAGG CCGACGTAT CTCCACCGCC ACCTCGGTAG CCGTCGGCCA GGGCCCGGTC
 45 1270 1280 1290 1300 1310 1320
 CTGGCCGACA CGGGCGTCCG CGAGCACCTG CACATCAACG CCGTCGGCGC GGACCTCGTC
 1330 1340 1350 1360 1370 1380
 50 GGCAAGACGG AACTGCCGCT CGGCCTGCTC GAGCGGGCGT TCGTCACCGC CGACCACCCC
 1390 1400 1410 1420 1430 1440
 GAGCAGGCCG TGCGCGAGGG CGAGTGCCAG CAACTCTCCG CCGACCGGCT CGGCCCGCAG
 1450 1460 1470 1480 1490 1500
 55 CTGGCCCCACC TGTGCGCCGA CCCGGCGGCC GCCGCCGGCC GGCAGGACAC CCTGAGCGTC
 1510 1520 1530 1540 1550 1560
 TTTCGACTCCA CGGGCTTCGC CTTCGAGGAC GCCCTGGCGA TGGAAAGTGTG CCTCGAGGCC
 60 1570 1580 1590 1600 1610 1620
 GCCGCCGAAAC GGGACCTGGG CATCCGGGTG GGCACTGAAC ACCACCCCCGG CGACGGCCCTG
 1630 1640 1650 1660 1670 1680
 65 GACCCCTACG CCCTCCAGCC CCTGCCCTG CCCCTGGCCG CCCCCGCCA CTGACCCCCC
 1690 1700 1710 1720 1730 1740
 CCTTTTTTCG GGACCCCCGC TCTTTTTCGA GACCCCCGCC CGGCCGGCCC GGCCCTCCTC

	1750	1760	1770	1780	1790	1800
	CCGCCGGCCC	CCATGCCCGG	CCGGGCCGGG	GCACCCACGA	CGCCCTCGCG	AGGAGAGAGA
5	1810	1820	1830	1840	1850	1860
	TGCCCCCAC	CCCCCGGCC	ACCACCGACG	ACGGCGGGCG	TGAAC TGCTC	GCCTGGCTGC
	1870	1880	1890	1900	1910	1920
	GCGAGATGCG	CCACCA ACCAC	CCC GTCCACG	AGGACGAATA	CGGTGCCTTC	CACGTCTTCC
10	1930	1940	1950	1960	1970	1980
	GGCACGCCGA	CGT CCTCACC	GT CGCCTCCG	ACCCCGGGCT	CTACT CCTCC	CAGCTCAGCC
	1990	2000	2010	2020	2030	2040
15	GGCTACGGCC	CGGCTCCCAG	GCGTTGAGCG	AACAGATCCT	GTCGGTCATC	GACCCGCCGA
	2050	2060	2070	2080	2090	2100
	TGCACCGCAC	CCT GCGCCGC	CTGGTCAGCC	AGG CTTCAC	CCCCCGCACC	GTCGCGGACC
20	2110	2120	2130	2140	2150	2160
	TCGAACACAG	CGT CACCGAA	CTGGCCGGGC	AACTGCTCGA	CGCCGTCGAC	GGCGACACGT
	2170	2180	2190	2200	2210	2220
	TCGACCTCGT	CGCCGACTTC	GCCTACCCGC	TGCCC GTGAT	CGTGATCGCC	GAAC TCCCTCG
25	2230	2240	2250	2260	2270	2280
	GCCTGCGCGC	CGCCGACCGC	ACC CTGTTCC	GTC CCTGGTC	CGACCGGATG	CTGCAGATGC
	2290	2300	2310	2320	2330	2340
30	AGGTCGCCGA	CCC GGCGGAC	ATGCAGTTCG	GCGACGACGC	CGACGGAGGAC	TACCAACGCC
	2350	2360	2370	2380	2390	2400
	TCGTCAAAGA	ACCCATGCGC	GCCATGCAGC	CCTACCTCCA	CGACCA CGTC	ACCGACCGCC
35	2410	2420	2430	2440	2450	2460
	GCGCCCGCCC	CGCGAACGAC	CTGATCTCCG	CACTCGT CGC	CGCCCGCGTG	GAGGGCGAAC
	2470	2480	2490	2500	2510	2520
	GACTCACCGA	CGAGCAGATC	GTCGAATT CG	GGGC GCTGCT	GCTGATGGCC	GGCCACGTCT
40	2530	2540	2550	2560	2570	2580
	CCACCTCCAT	GCTGCTCGGC	AAAC ACCGTGC	TGTGCCTGAA	GGACCAACCCC	CGGGCCGAGG
	2590	2600	2610	2620	2630	2640
45	CCGCCGCCCG	CGCCGACCGG	TCCCTGATCC	CCGCCCTGAT	CGAAGAAGTA	CTGCGGCTGC
	2650	2660	2670	2680	2690	2700
	GGCCGCCGAT	CACCGTCATG	GCCCGCGTC	CCACCAAGGA	CACCGTCCTC	GCCGGCACCA
50	2710	2720	2730	2740	2750	2760
	CCATCCCCGC	CGGACGCATG	GTCGTGCCCT	CCCTGCTGTC	CGCCAACCCAC	GACGAACAGG
	2770	2780	2790	2800	2810	2820
	TCTTCACCGA	CCCCGACCCAC	CTCGACCTCG	CCCGCGAAGG	CCGCCAGATC	GCCTTCGGCC
55	2830	2840	2850	2860	2870	2880
	ACGGCATCCA	CTACTGCCTG	GGCGCCCCGC	TGCGCCGCCT	GGAGGGCCGC	ATCGCCCTGG
	2890	2900	2910	2920	2930	2940
60	AAGCCCTCTT	CGACCGATT	CCCGACTTCT	CGCCCCACCGA	CGGCGAAAA	CTGCGCTACC
	2950	2960	2970	2980	2990	3000
	ACCGCGACGG	ACTGTTCGGC	GTC AAGAAC	TGCGCGTGAC	CGTACGGCGC	GGCTGACACA
65	3010	3020	3030	3040	3050	3060
	GACAAGGGGG	CCACCTGGTG	CGCACCGTGC	GAACCTGCT	GATCGACAAAC	TACGACTCGT

	3070	3080	3090	3100	3110	3120
	TCACCTACAA	CCTCTTCCAG	ATGCTGGCGG	AGGTGAACGG	CGCCGCTCCG	CTCGTCGTCC
5	3130	3140	3150	3160	3170	3180
	GCAACGACGA	CACCCGCACC	TGGCAGGCC	TGGCGCCGGG	CGACTTCGAC	AACGTCGTG
	3190	3200	3210	3220	3230	3240
	TCTCACCCGG	CCCCGGCCAC	CCC GCCACCG	ACACCGACCT	GGGCCTCAGC	CGCCGGGTGA
10	3250	3260	3270	3280	3290	3300
	TCACCGAATG	GGACCTGGCG	CTGCTCGGGG	TGTGCCTGGG	CCACCAAGGCC	CTGTGCCTGC
	3310	3320	3330	3340	3350	3360
15	TCGCCGGCGC	CGCCGTCGTC	CACGCACCCG	AACCCTTCA	CGGCCGCACC	AGCGACATCC
	3370	3380	3390	3400	3410	3420
	GCCACGACGG	GCAGGGCCTG	TTCGCGAAC	TCCCCCTCCCC	GCTGACCGTG	GTCCGCTACC
20	3430	3440	3450	3460	3470	3480
	ACTCGCTGAC	CGTCCGGCAA	CTGCCC	ACCTGCGC	CACCGCCCAC	ACCGCCGACG
	3490	3500	3510	3520	3530	3540
	GGCAGCTGAT	GGCCGTCGCC	CACCGCCACC	TGCCCCGCTT	CGGCGTGCAG	TTCCACCCCG
25	3550	3560	3570	3580	3590	3600
	AATCGATCAG	CAGCGAACAC	GGCCACCGGA	TGCTCGCCAA	CTTCCGGAC	CTGTCCCTGC
	3610	3620	3630	3640	3650	3660
30	GCGCGGCCGG	CCACCGCCCC	CCGCACACCG	AACGCATACC	CGCACCCGCA	CCCGCCCCCG
	3670	3680	3690	3700	3710	3720
	CCCCCGCCCC	CGCACCGGCA	CCGCCCCGCGT	CCGCGCCGGT	GGGGGAGTAC	CGGCTGCATG
35	3730	3740	3750	3760	3770	3780
	TGCGCGAGGT	CGCCTGCGTG	CCCGACGCGG	ACGCCGCGTT	CACCGCCCTG	TTCGCCGACG
	3790	3800	3810	3820	3830	3840
	CCCCGGCCCC	GTTCTGGCTC	GACAGCAGCC	GGCTCGAGCC	GGGCTCGCC	CGCTTCACCT
40	3850	3860	3870	3880	3890	3900
	TCCTCGGCCG	CCCCGCCGGC	CCGCTCGGGC	AACAGATCAC	CTACGACGTC	GCCGACCGGG
	3910	3920	3930	3940	3950	3960
45	CCGTGCGCGT	CAAGGACGGT	TCAGGCGGGC	AGACCCGCGG	GCCGGCACC	CTCTTCGACC
	3970	3980	3990	4000	4010	4020
	ACCTGGAACA	CGAACTGGCC	GCCCCGCGCC	TGCCCCGCCAC	CGGCCTGCC	TTCGAGTTCA
50	4030	4040	4050	4060	4070	4080
	ACCTCGGCTA	CGTCGGCTAC	CTCGGCTAGC	AGACCAAGGC	CGACAGCGGC	GGCGAGGACG
	4090	4100	4110	4120	4130	4140
	CCCACCGCGG	CGAACTGCCC	GACGGCGCCT	TCATGTTCGC	CGACCGGATG	CTCGCCCTCG
55	4150	4160	4170	4180	4190	4200
	ACCACGAACA	GGGGCGGGCC	TGGCTCCTGG	CACTGAGCAG	CACCCGACGG	CCCGCCACCG
	4210	4220	4230	4240	4250	4260
60	CACCCGCGC	CGAACGCTGG	CTCACCGAC	CCGCCCCGGAC	CCTCCGCCACC	ACCGCCCCCG
	4270	4280	4290	4300	4310	4320
	GCCCCGCC	CACCCGCTG	CCCGACGACC	AACTGCCCCG	CCTGGACGTC	CACTACCGCC
65	4330	4340	4350	4360	4370	4380
	ACAGCCTGCC	CCGCTACCGG	GAACTGGTCG	AGGAATGCCG	CCGCCTGATC	ACCGACGGCG
	4390	4400	4410	4420	4430	4440

AGACCTACGA GGTGTGCCTG ACGAACATGC TCCGGGTGCC CGGCCGGATC GACCCGCTCA
 4450 4460 4470 4480 4490
 CCGCCTACCG CGCCCTGCAG ACCGTCAGCC CCGCCCCCTA CGCCGCCTAC CTGCAG
 5

(6) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 5:

	(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:	
10	(A) LONGUEUR: 1065 paires de bases	
	(B) TYPE: acide nucléique	
	(C) NOMBRE DE BRINS: double	
	(D) CONFIGURATION: linéaire	
	(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC	
	(iii) HYPOTHETIQUE: NON	
15	(iii) ANTI-SENS: NON	
	(vi) ORIGINE:	
	(A) ORGANISME: Streptomyces pristinaespiralis	
20	(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 5	
25	ATG GAG ACC TGG GTC CTG GGC CGG CGC GAC GTC GCC GAG GTG GTG GCC GTC Met Glu Thr Trp Val Leu Gly Arg Arg Asp Val Ala Glu Val Val Ala Ala Val	54 18
30	GGC CGC GAC GAA CTC ATG CGC CGC ATC ATC GAC CGC CTC ACC GGC GGA CTG GCC Gly Arg Asp Glu Leu Met Arg Arg Ile Ile Asp Arg Leu Thr Gly Gly Leu Ala	108 36
35	GAG ATC GGC CGC GGC GAG CGG CAC CTG TCC CCG CTG CGC GGC GGA CTG GAA CGC Glu Ile Gly Arg Gly Glu Arg His Leu Ser Pro Leu Arg Gly Leu Glu Arg	162 54
40	AGC GAA CCC GTG CCC GGC ATC TGG GAA TGG ATG CCG CAC CGC GAA CCC GGC GAC Ser Glu Pro Val Pro Gly Ile Trp Glu Trp Met Pro His Arg Glu Pro Gly Asp	216 72
45	CAC ATC ACC CTC AAG ACC GTC GGC TAC AGC CCC GCC AAC CCC GGC CGC TTC GGC His Ile Thr Leu Lys Thr Val Gly Tyr Ser Pro Ala Asn Pro Gly Arg Phe Gly	270 90
50	CTG CCG ACC ATC CTG GGC ACC GTC GCC CGC TAC GAC GAC ACC ACC GGC GCC CTG Leu Pro Thr Ile Leu Gly Thr Val Ala Arg Tyr Asp Asp Thr Thr Gly Ala Leu	324 108
55	ACC GCC CTG ATG GAC GGC GTG CTG CTC ACC GCC CTG CGC ACC GGC GGC GCC TCC Thr Ala Leu Met Asp Gly Val Leu Leu Thr Ala Leu Arg Thr Gly Ala Ala Ser	378 126
	GCC GTC GCC TCC CGC CTG CTG GCC CGC CCC GAC AGC CAC ACC CTG GGA CTG ATC Ala Val Ala Ser Arg Leu Leu Ala Arg Pro Asp Ser His Thr Leu Gly Leu Ile	432 144
	GGC ACC GGC GCC CAG GCC GTC ACC CAA CTG CAC GCC CTG TCC CTG CTG GTA CTG CCC Gly Thr Gly Ala Gln Ala Val Thr Gln Leu His Ala Leu Ser Leu Val Leu Pro	486 162

	CTG CAA CGG GCC CTG GTG TGG GAC ACC GAC CCC GCC CAC CGG GAA AGC TTC GCC Leu Gln Arg Ala Leu Val Trp Asp Thr Asp Pro Ala His Arg Glu Ser Phe Ala	540 180
5	CGG CGC GCC GCG TTC ACC GGC GTC AGC GTC GAG ATC GCC GAG CCC GCC CGG ATC Arg Arg Ala Ala Phe Thr Gly Val Ser Val Glu Ile Ala Glu Pro Ala Arg Ile	594 198
10	GCC GCC GAG GCC GAC GTC ATC TCC ACC GCC ACC TCG GTA GCC GTC GGC CAG GGC Ala Ala Glu Ala Asp Val Ile Ser Thr Ala Thr Ser Val Ala Val Gly Gln Gly	648 216
15	CCG GTC CTG CCC GAC ACC GGC GTC CGC GAG CAC CTG CAC ATC AAC GCC GTC GGC Pro Val Leu Pro Asp Thr Gly Val Arg Glu His Leu His Ile Asn Ala Val Gly	702 234
20	GCG GAC CTC GTC GGC AAG ACG GAA CTG CCG CTC GGC CTG CTC GAG CGG GCG TTC Ala Asp Leu Val Gly Lys Thr Glu Leu Pro Leu Gly Leu Leu Glu Arg Ala Phe	756 252
25	GTC ACC GCC GAC CAC CCC GAG CAG GCG CTG CGC GAG GGC GAG TGC CAG CAA CTC Val Thr Ala Asp His Pro Glu Gln Ala Leu Arg Glu Gly Glu Cys Gln Gln Leu	810 270
30	TCC GCC GAC CGG CTC GGC CCC CAG CTG GCC CAC CTG TGC GCC GAC CCG GCG GCC Ser Ala Asp Arg Leu Gly Pro Gln Leu Ala His Leu Cys Ala Asp Pro Ala Ala	864 288
35	GCC GCC GGC CGG CAG GAC ACC CTG AGC GTC TTC GAC TCC ACC GGC TTC GCC TTC Ala Ala Gly Arg Gln Asp Thr Leu Ser Val Phe Asp Ser Thr Gly Phe Ala Phe	918 306
40	GAG GAC GCC CTG GCG ATG GAA GTG TTC CTC GAG GCC GCC GAA CGG GAC CTG Glu Asp Ala Leu Ala Met Glu Val Phe Leu Glu Ala Ala Glu Arg Asp Leu	972 324
45	GGC ATC CGG GTG GGC ATC GAA CAC CAC CCC GGC GAC GCC CTG GAC CCC TAC GCC Gly Ile Arg Val Gly Ile Glu His His Pro Gly Asp Ala Leu Asp Pro Tyr Ala	1026 342
	CTC CAG CCC CTG CCC CTG GCC GCC CCC GCC CAC Leu Gln Pro Leu Pro Leu Ala Ala Pro Ala His	1065 355

(7) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 6:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 50 (A) LONGUEUR: 1194 paires de bases
 (B) TYPE: acide nucléique
 (C) NOMBRE DE BRINS: double
 (D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC
- (iii) HYPOTHETIQUE: NON
- 55 (iii) ANTI-SENS: NON
- (vi) ORIGINE:
 (A) ORGANISME: Streptomyces pristinaespiralis

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 6

5	ATG CCC CCC ACC CCC CGG CCC ACC ACC GAC GAC GGC GGC CGT GAA CTG CTC GCC Met Pro Pro Thr Pro Arg Pro Thr Thr Asp Asp Gly Gly Arg Glu Leu Leu Ala	54 18
10	TGG CTG CGC GAG ATG CGC CAC CAC CCC GTC CAC GAG GAC GAA TAC GGT GCC Trp Leu Arg Glu Met Arg His His Pro Val His Glu Asp Glu Tyr Gly Ala	108 36
15	TTC CAC GTC TTC CGG CAC GCC GAC GTC CTC ACC GTC GCC TCC GAC CCC GGC GTC Phe His Val Phe Arg His Ala Asp Val Leu Thr Val Ala Ser Asp Pro Gly Val	162 54
20	TAC TCC TCC CAG CTC AGC CGG CTA CGG CCC GGC TCC CAG GCG TTG AGC GAA CAG Tyr Ser Ser Gln Leu Ser Arg Leu Arg Pro Gly Ser Gln Ala Leu Ser Glu Gln	216 72
25	ATC CTG TCG GTC ATC GAC CCG CCG ATG CAC CGC ACC CTG CGC CGC CTG GTC AGC Ile Leu Ser Val Ile Asp Pro Pro Met His Arg Thr Leu Arg Arg Leu Val Ser	270 90
30	CAG GCC TTC ACC CCC CGC ACC GTC GCC GAC CTC GAA CCA CGC GTC ACC GAA CTG Gln Ala Phe Thr Pro Arg Thr Val Ala Asp Leu Glu Pro Arg Val Thr Glu Leu	324 108
35	GCC GGG CAA CTG CTC GAC GCC GAC GGC GAC ACG TTC GAC CTC GTC GCC GAC Ala Gly Gln Leu Leu Asp Ala Val Asp Gly Asp Thr Phe Asp Leu Val Ala Asp	378 126
40	TTC GCC TAC CCG CTG CCC GTG ATC GTG ATC GCC GAA CTC CTC GGC GTG CCG CCC Phe Ala Tyr Pro Leu Pro Val Ile Ala Glu Leu Leu Gly Val Pro Pro	432 144
45	GCC GAC CGC ACC CTG TTC CGC TCC TGG TCC GAC CGG ATG CTG CAG ATG CAG GTC Ala Asp Arg Thr Leu Phe Arg Ser Trp Ser Asp Arg Met Leu Gln Met Gln Val	486 162
50	GCC GAC CCG GCG GAC ATG CAG TTC GGC GAC GAC GGC GAC GAG GAC TAC CAA CGC Ala Asp Pro Ala Asp Met Gln Phe Gly Asp Asp Ala Asp Glu Asp Tyr Gln Arg	540 180
55	CTC GTC AAA GAA CCC ATG CGC GCC ATG CAC GGC TAC CTC CAC GAC CAC GTC ACC Leu Val Lys Glu Pro Met Arg Ala Met His Ala Tyr Leu His Asp His Val Thr	594 198
60	GAC CGC CGC GCC CGC CCC GCG AAC GAC CTG ATC TCC GCA CTC GTC GCC GCG Asp Arg Arg Ala Arg Pro Ala Asn Asp Leu Ile Ser Ala Leu Val Ala Ala Arg	648 216
65	GTG GAG GGC GAA CGA CTC ACC GAC GAG CAG ATC GTC GAA TTC GGG GCG CTG CTG Val Glu Gly Glu Arg Leu Thr Asp Glu Gln Ile Val Glu Phe Gly Ala Leu Leu	702 234
70	CTG ATG GCC GGC CAC GTC TCC ACC TCC ATG CTG CTC GGC AAC ACC GTG CTG TGC Leu Met Ala Gly His Val Ser Thr Ser Met Leu Leu Gly Asn Thr Val Leu Cys	756 252
75	CTG AAG GAC CAC CCC CGG GCC GAG GCC GCC CGC GGC GAC CGG TCC CTG ATC Leu Lys Asp His Pro Arg Ala Glu Ala Ala Arg Ala Asp Arg Ser Leu Ile	810 270
80	CCC GCC CTG ATC GAA GAA GTA CTG CGG CTG CGG CCG CCG ATC ACC GTC ATG GCC Pro Ala Leu Ile Glu Glu Val Leu Arg Leu Arg Pro Pro Ile Thr Val Met Ala	864 288

	CGC GTC ACC ACC AAG GAC ACC GTC CTC GCC GGC ACC ACC ATC CCC GCC GGA CGC	918
	Arg Val Thr Thr Lys Asp Thr Val Leu Ala Gly Thr Thr Ile Pro Ala Gly Arg	306
5	ATG GTC GTG CCC TCC CTG CTG TCC GCC AAC CAC GAC GAA CAG GTC TTC ACC GAC	972
	Met Val Val Pro Ser Leu Leu Ser Ala Asn His Asp Glu Gln Val Phe Thr Asp	324
10	CCC GAC CAC CTC GAC CTC GCC CGC GAA GGC CGC CAG ATC GGC TTC GGC CAC GGC	1026
	Pro Asp His Leu Asp Leu Ala Arg Glu Gly Arg Gln Ile Ala Phe Gly His Gly	342
15	ATC CAC TAC TGC CTG GGC GCC CCG CTC GCC CGC CTG GAG GGC CGC ATC GCC CTG	1080
	Ile His Tyr Cys Leu Gly Ala Pro Leu Ala Arg Leu Glu Gly Arg Ile Ala Leu	360
20	GAA GCC CTC TTC GAC CGA TTC CCC GAC TTC TCG CCC ACC GAC GGC GCA AAA CTG	1134
	Glu Ala Leu Phe Asp Arg Phe Pro Asp Ser Pro Thr Asp Gly Ala Lys Leu	378
25	CGC GGC	1194
	Arg Gly	398

(8) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 7:

30	(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
	(A) LONGUEUR: 1561 paires de bases
	(B) TYPE: acide nucléique
	(C) NOMBRE DE BRINS: double
	(D) CONFIGURATION: linéaire
35	(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc
	(iii) HYPOTHETIQUE: NON
	(iv) ANTI-SENS: NON
	(v) ORIGINE:
	(A) ORGANISME: Streptomyces pristinaespiralis
40	(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 7

45	10 20 30 40 50 60
	AAGCTTCCCG ACCGGGTGGA GGTCTCGAC GCGTTCCCGC TGACCGGCCT CAACAAGGTC
	70 80 90 100 110 120
50	GACAAGAAGG CCCTGGCGGC CGACATCGCC GCCAAGACCG CCCCCACCCG CCCCACCAAC
	130 140 150 160 170 180
	GCGGCCACG GCGCGACCAC GGACGGCGAT ACGGCCGGTG GGGGTGGTGC CGGGGGCGGG
55	190 200 210 220 230 240
	GTGACGGCCG CGGGTGGCGG GCGGGAGGAG GCGGCGTGAG CGGGCCCGGG CCCGAGGGCG
	250 260 270 280 290 300
	GCTACCGGGT GCGCTTCGCG CGACGCGGTT CGGTGGTGGG CGAGGCGGAC CTGGCGGCG

	310	320	330	340	350	360
	TGGGCGAACT	GGTCCGCTCG	GGCCGGTCGC	TGACGTCGGG	GGTGTGGCGG	GAGCGGTTTCG
5	370	380	390	400	410	420
	AGGAACAGTT	CGCCCCGCTG	ACCGGGCGCC	GGCACGGCCT	CAGTGTCAACC	AGCGGCACCG
	430	440	450	460	470	480
	TCGGCGCTGGA	ACTGGCGGTG	CGGATGCTGG	ACCTGGCGC	GGGCAGCGAG	GTGATCGCCA
10	490	500	510	520	530	540
	CCCCGCAGAC	GTTCCAGGCG	ACGGTGCGAGC	CGCTGCTCGA	CCACGACGTG	CGGCTGCGGT
	550	560	570	580	590	600
15	TCTGCCACAT	CGACCCGGAC	ACCCCTCAACC	TCGACCCGGC	GGTGCTGGAG	ACGCTGATCA
	610	620	630	640	650	660
	CCGACCGCAC	CCGGGCGATC	CTGCTCGTCC	ACTACGGCGG	CAACCCGGCC	GACATGGACC
20	670	680	690	700	710	720
	GCATCATGGC	CCTGGCCCCG	AAGCGCGGC	TCATCGTCGT	CGAGGACAGC	GCGCACGCC
	730	740	750	760	770	780
	TGGGGCCCGT	GTACCGGGGG	CGGGCGCCGG	GGGCACTGGC	GGACATCGGC	TGCTTCACTT
25	790	800	810	820	830	840
	TCCACTCCAC	GAAGAACATC	ACCACCCCTCG	GCGAGGGCGG	CATGATCACC	CTGTCCCGTG
	850	860	870	880	890	900
30	ACGAGTGGGC	CCAGCGGGTG	GGACGTATCC	GCGACAACGA	GGCCGACGGC	GTGTACGGCG
	910	920	930	940	950	960
	CGCTGCCGGA	CTCCGCGCGG	CGGGGTGCTC	CGGGCGCTGCT	GCCGTGGATG	AAGTTCGCGG
35	970	980	990	1000	1010	1020
	AGGGTGTGTA	CGGTCACCGG	CGGGTCGGGG	TCCGCGGGGC	GGGCACGAAC	GCGACGATGT
	1030	1040	1050	1060	1070	1080
	CGGAGGCGGC	GGCGCGGTG	GGCGTGGTGC	AACTGGCGTC	GCTGGAGCGG	TTCGTGGCCC
40	1090	1100	1110	1120	1130	1140
	GGCGCCGGAG	CATCGCGCAG	CGGCTGGACG	AGGCCGTGGC	CTCGGTGGCC	GGCACCCGGC
	1150	1160	1170	1180	1190	1200
45	TGCACCGGGC	GGCGCGGGAC	AGTCTGCACG	CCTACCAACCT	GTACACGTT	TTCCTCACCG
	1210	1220	1230	1240	1250	1260
	GCGGCCGGCA	GGTGCGGGAG	CGGTTCTGTC	GCGCCCTGGA	CCGGCTGGGT	GTGGAGGTCC
50	1270	1280	1290	1300	1310	1320
	AGTTGCGGTA	CTTCCCCGTC	CATCTGTCCG	CCGAGTGGCG	GCTGGCGCC	CACGGGCGGG
	1330	1340	1350	1360	1370	1380
	GCGAGTGTCC	GACGGGCCAA	CGGGTCTGGT	TCGAGGAGCA	CATGAACCTG	CCGTGCCATC
55	1390	1400	1410	1420	1430	1440
	CCGGTCTGAG	TGACGGCCAG	GTCGACTACA	TGGTCGAGGC	GGTCACCCGC	GCCCTGCACCG
	1450	1460	1470	1480	1490	1500
60	AGGCCACCGG	CACGGGGACG	CGGGTGGCGG	CCGGGCACCT	GTGACACCGT	CCGCATCCGG
	1510	1520	1530	1540	1550	1560
	CCGGTGGTT	TCCAAGACCG	AGGGAGAGGC	AGGCATATCC	CGTTCATCGA	AGTGAAGATC

(9) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 8:

5

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 1233 paires de bases
 (B) TYPE: acide nucléique
 (C) NOMBRE DE BRINS: double
 (D) CONFIGURATION: linéaire

10

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc
 (iii) HYPOTHETIQUE: NON
 (iv) ANTI-SENS: NON

15

(vi) ORIGINE:
 (A) ORGANISME: Streptomyces pristinaespiralis
 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 8

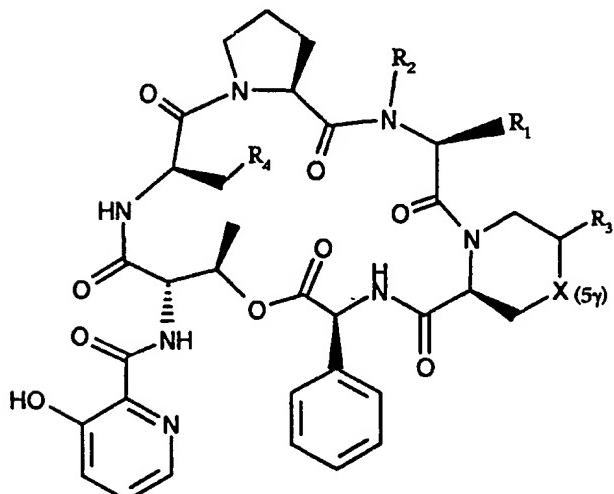
20	GTG CCG TTC GCG CGA CGC GGT TCG GTG GTG GGC GAG GCG GAC CTG GCG GCG CTG Val Pro Phe Ala Arg Arg Gly Ser Val Val Gly Glu Ala Asp Leu Ala Ala Leu	54 18
25	GGC GAA CTG GTC CGC TCG GGC CGG TCG CTG ACG TCG GGG GTG TGG CGG GAG CGG Gly Glu Leu Val Arg Ser Gly Arg Ser Leu Thr Ser Gly Val Trp Arg Glu Arg	108 36
30	TTC GAG GAA CAG TTC GCC CGC CTG ACC GGC GCC CGG CAC GCG CTC AGT GTC ACC Phe Glu Glu Gln Phe Ala Arg Leu Thr Gly Ala Arg His Ala Leu Ser Val Thr	162 54
35	AGC GGC ACC GTC GCG CTG GAA CTG GCG GTG CGG ATG CTG GAC CTG GCG CCG GGC Ser Gly Thr Val Ala Leu Glu Leu Ala Val Arg Met Leu Asp Leu Ala Pro Gly	216 72
40	GAC GAG GTG ATC GCC ACC CCG CAG ACG TTC CAG GCG ACG GTG CAG CCG CTG CTC Asp Glu Val Ile Ala Thr Pro Gln Thr Phe Gln Ala Thr Val Gln Pro Leu Leu	270 90
45	GAC CAC GAC GTG CGG CTG CGG TTC TGC GAC ATC GAC CCG GAC ACC CTC AAC CTC Asp His Asp Val Arg Leu Arg Phe Cys Asp Ile Asp Pro Asp Thr Leu Asn Leu	324 108
50	GAC CCG GCG GTG CTG GAG ACG CTG ATC ACC GAC CGC ACC CGG GCG ATC CTG CTC Asp Pro Ala Val Leu Glu Thr Leu Ile Thr Asp Arg Thr Arg Ala Ile Leu Leu	378 126
55	GTC CAC TAC GGC GGC AAC CCG GCC GAC ATG GAC CGC ATC ATG GCC CTG GCC CGC Val His Tyr Gly Gly Asn Pro Ala Asp Met Asp Arg Ile Met Ala Leu Ala Arg	432 144
	AAG CGC GGC ATC ATC GTC GTC GAG GAC AGC GCG CAC GCG CTG GGC GCC GTG TAC Lys Arg Gly Ile Ile Val Val Glu Asp Ser Ala His Ala Leu Gly Ala Val Tyr	486 162
	CGG GGG CGG CGG CCG GGG GCA CTG GCG GAC ATC GGC TGC TTC ACT TTC CAC TCC Arg Gly Arg Arg Pro Gly Ala Leu Ala Asp Ile Gly Cys Phe Thr Phe His Ser	540 180

	ACG AAG AAC ATC ACC ACC CTC GGC GAG GGC GGC ATG ATC ACC CTG TCG CGT GAC Thr Lys Asn Ile Thr Thr Leu Gly Glu Gly Met Ile Thr Leu Ser Arg Asp	594 198
5	GAG TGG GCC CAG CGG GTG GGA CGT ATC CGC GAC AAC GAG GCC GAC GGC GTG TAC Glu Trp Ala Gln Arg Val Gly Arg Ile Arg Asp Asn Glu Ala Asp Gly Val Tyr	648 216
10	GCG GCG CTG CCG GAC TCC GCG CGG GCG GGT GCT CCG GCG CTG CTG CCG TGG ATG Ala Ala Leu Pro Asp Ser Ala Arg Ala Pro Ala Leu Leu Pro Trp Met	702 234
15	AAG TTC GCG GAG GGT GTG TAC GGT CAC CGG GCG GTC GGG GTC CGC GGG GCG GGC Lys Phe Ala Glu Gly Val Tyr Gly His Arg Ala Val Gly Val Arg Gly Ala Gly	756 252
	ACG AAC GCG ACG ATG TCG GAG GCG GCG GCG GTG GGC GTG GTG CAA CTG GCG Thr Asn Ala Thr Met Ser Glu Ala Ala Ala Val Gly Val Val Gln Leu Ala	810 270
20	TCG CTG GAG CGG TTC GTG GCC CGG CGC CGG AGC ATC GCG CAG CGG CTG GAC GAG Ser Leu Glu Arg Phe Val Ala Arg Arg Ser Ile Ala Gln Arg Leu Asp Glu	864 288
25	GCC GTG GCC TCG GTG GCC GGC ACC CGG CTG CAC CGG GCG GCG GCG GAC AGT CTG Ala Val Ala Ser Val Ala Gly Thr Arg Leu His Arg Ala Ala Ala Asp Ser Leu	918 306
30	CAC GCC TAC CAC CTG TAC ACG TTC TTC CTC ACC GGC GGC CGG CAG GTG CGG GAG His Ala Tyr His Leu Tyr Thr Phe Phe Leu Thr Gly Gly Arg Gln Val Arg Glu	972 324
35	CGG TTC GTG CGC GCC CTG GAC CGG CTG GGT GTG GAG GTC CAG TTG CGG TAC TTC Arg Phe Val Arg Ala Leu Asp Arg Leu Gly Val Glu Val Gln Leu Arg Tyr Phe	1026 342
	CCG CTC CAT CTG TCG CCC GAG TGG CGG CTG CGC GGC CAC GGG CCG GGC GAG TGT Pro Leu His Leu Ser Pro Glu Trp Arg Leu Arg Gly His Gly Pro Gly Glu Cys	1080 360
40	CCG ACG GCC GAA CGG GTC TGG TTC GAG GAG CAC ATG AAC CTG CCG TGC CAT CCC Pro Thr Ala Glu Arg Val Trp Phe Glu Glu His Met Asn Leu Pro Cys His Pro	1134 378
45	GGT CTG AGT GAC GGC CAG GTC GAC TAC ATG GTC GAG GCG GTC ACC CGC GCC CTG Gly Leu Ser Asp Gly Gln Val Asp Tyr Met Val Glu Ala Val Thr Arg Ala Leu	1188 396
50	CAC GAG GCC CAC GGC ACG GGG ACG CGG GTG GCG GCC GGG CAC CTG His Glu Ala His Gly Thr Gly Arg Val Ala Ala Gly His Leu	1233 411

REVENDICATIONS

1. Composé caractérisé en ce qu'il est représenté par la formule générale I

5

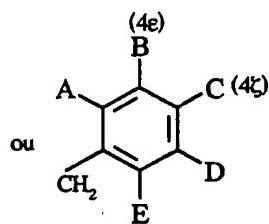
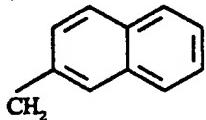
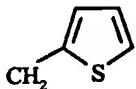


I

dans laquelle :

-R₂ et R₄ représentent, indépendamment l'un de l'autre, un atome d'hydrogène ou un groupement méthyle,

-R₃ représente un atome d'hydrogène ou un groupement hydroxyle,
- X représente un groupement CO, CHOH ou CH₂ et
-R₁ représente:



15

avec

- pour les dérivés méta :

A, C, D et E représentant un atome d'hydrogène et

B pouvant représenter:

20

- un halogène et de préférence un atome de fluor,

- un groupement monoalkylamino ou dialkylamino avec alkyle représentant de préférence un groupement méthyle ou éthyle,
 - un groupement éther.
 - un groupement thioéther,
- 5 -un groupement alkyle en C₁ à C₃ ou
- un groupement trihalogénométhyle et de préférence le trifluorométhyle.
- pour les dérivés para :
- A, B, D et E représentant un atome d'hydrogène et
- 10 C pouvant représenter:
- un halogène,
 - un groupement NR₁R₂ avec R₁ et R₂ représentant indépendamment l'un de l'autre un groupement choisi parmi
 - l'hydrogène,
 - un groupement alkyle en C₁ à C₄ linéaire ou ramifié avec lorsque l'un des substituants R₁ ou R₂, représente un groupement méthyle, l'autre représente obligatoirement un groupement éthyle,
 - un groupement alkyl-cycloalkylméthyle avec un cycloalkyl en C₃ à C₄

15 - un groupement cycloalkyle en C₃ à C₄ éventuellement substitué,

 - un groupement alcényle en C₁ à C₄ linéaire ou ramifié avec lorsque l'un des substituants R₁ ou R₂, représente un groupement alcényle, l'autre est différent d'un groupement méthyle ou d'un groupement cycloalkyle en C₃ à C₆,
 - un groupement N-pyrrolidinyle substitué ou non,
- 20
- 25 -un groupement éther,
- un groupement thioéther,
 - un groupement acyle ou alcoxycarbonyle,
 - un groupement alkyle en C₁ à C₆, linéaire ou ramifié, et de préférence choisi parmi les groupements méthyle, isopropyle et tert-butyle,
- 30 - un groupement alkylthiométhyle,
- un groupement aryle et de préférence un phényle ou
 - un groupement trihalogénométhyle et de préférence le trifluorométhyle et
- pour les dérivés disubstitués méta-para :
- 35 A, D et E représentant un atome d'hydrogène et

B pouvant représenter:

- un halogène et de préférence un atome de fluor,
- un groupement monoalkylamino ou dialkylamino avec alkyle représentant de préférence un groupement méthyle ou éthyle,
- 5 -un groupement éther,
- un groupement thioéther,
- un groupement alkyle en C₁ à C₃ et

C pouvant représenter:

- un halogène et de préférence un atome de fluor,
 - 10 -un groupement amino, monoalkylamino ou dialkylamino avec alkyle représentant de préférence un groupement méthyle à la condition que B soit différent d'un atome de brome ou de chlore, ou un groupement allyle substitué ou non,
 - un groupement éther,
 - 15 -un groupement thioéther,
 - un groupement alkyle en C₁ à C₆ ou
 - un groupement trihalogénométhyle et de préférence le trifluorométhyle et
- pour les dérivés disubstitués ortho-para :*
- 20 B, E et D représentant un atome d'hydrogène et A et C, un groupement méthyle.

2. Composé selon la revendication 1 caractérisé en ce qu'il s'agit de préférence de:

- la 4 ζ -méthylthio-dés(4 ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A,
- 25 la 4 ζ -méthylthio-dés(4 ζ -diméthylamino) pristinamycine I_H,
- la 5 γ -hydroxy 4 ζ -méthylthio-dés(4 ζ -diméthylamino) pristinamycine I_H,
- la 4 ζ -méthyl-dés(4 ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A,
- la 4 ζ -méthyl-dés(4 ζ -diméthylamino) pristinamycine I_H,
- la 4 ζ -méthoxy-dés(4 ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A,
- 30 la 4 ζ -méthoxycarbonyl-dés(4 ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A,
- la 4 ζ -chloro-dés(4 ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A,
- la 4 ζ -bromo-dés(4 ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A,
- la 4 ζ -bromo-dés(4 ζ -diméthylamino) pristinamycine I_H,
- la 4 ζ -iodo-dés(4 ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A,

- la 4ζ -iodo-dés(4ζ -diméthylamino) pristinamycine I_H,
- la 4ζ -trifluorométhyl-dés(4ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A,
- la 4ζ -trifluorométhyl-dés(4ζ -diméthylamino) pristinamycine I_H,
- la 4ζ -tert-butyl-dés(4ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A,
- 5 la 4ζ -isopropyl-dés(4ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A,
- la 4ζ -isopropyl-dés(4ζ -diméthylamino) pristinamycine I_E,
- la 4ϵ -méthylamino-dés(4ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A,
- la 4ϵ -méthoxy-dés(4ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A,
- la 4ϵ -méthoxy-dés(4ζ -diméthylamino) pristinamycine I_H,
- 10 la 4ϵ -fluoro 4ζ -méthyl-dés(4ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A
- la 4ζ -amino-dés(4ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A
- la 4ζ -éthylamino-dés(4ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A
- la 4ζ -diéthylamino-dés(4ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A
- 15 la 4ζ -allylamino-dés(4ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A
- la 4ζ -diallylamino-dés(4ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A
- la 4ζ -allyl éthylamino-dés(4ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A
- la 4ζ -éthyl propylamino-dés(4ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A
- la 4ζ -éthyl isopropylamino-dés(4ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A
- 20 la 4ζ -éthyl méthylcyclopropylamino-dés(4ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A
- la 4ζ -(1-pyrrolidinyl) -dés(4ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A
- la 4ζ -trifluorométhoxy-dés(4ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A
- la 4ζ -allyloxy-dés(4ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A
- 25 la 4ζ -éthoxy-dés(4ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A
- la 4ζ -éthylthio-dés(4ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A
- la 4ζ -méthylthiométhyl-dés(4ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A
- la 4ζ -(2-chloroéthoxy)-dés(4ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A
- 30 la 4ζ -acetyl-dés(4ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A
- la 4ζ -éthyl-dés(4ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A
- la 4ζ -éthyl-dés(4ζ -diméthylamino) pristinamycine I_H
- la 4ϵ -diméthylamino-dés(4ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A
- la 4ϵ -méthylthio-dés(4ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A et
- la 4ϵ -éthoxy-dés(4ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A.

3. Procédé de préparation de streptogramines caractérisé en ce qu'il met en œuvre une souche d'un microorganisme producteur de streptogramines, possédant au moins une modification génétique affectant la biosynthèse d'un précurseur des streptogramines du groupe B et en ce que ladite souche mutante est cultivée sur un milieu de culture adéquat et complémenté avec au moins un précurseur original, autre que celui dont la biosynthèse est altérée et en ce que l'on récupère lesdites streptogramines.
- 10 4. Procédé selon la revendication 3 caractérisé en ce que la souche mutée possède au moins une modification génétique localisée au niveau d'un des gènes impliqués dans la biosynthèse des précurseurs des streptogramines du groupe B.
- 15 5. Procédé selon la revendication 4 caractérisé en ce que le ou les gènes, dont l'expression est altérée, sont choisis parmi les gènes impliqués dans la biosynthèse de l'acide L-2-aminobutyrique, le 4-diméthylamino-L-phénylalanine (DMPAPA), l'acide L-pipécolique, la L-phénylglycine et/ou l'acide 3-hydroxypicolinique.
- 20 6. Procédé selon la revendication 4 ou 5 caractérisé en ce qu'il s'agit d'au moins un gène choisi parmi les gènes papA, papM, papC (SEQ ID n° 2), papB (SEQ ID n° 3), pipA (SEQ ID n° 5), snbF (SEQ ID n° 6) et hpaA (SEQ ID n° 8).
- 25 7. Procédé selon l'une des revendications 3 à 6 caractérisé en ce que ladite modification génétique rend au moins l'un des gènes impliqués dans la biosynthèse de précurseurs de streptogramines du groupe B, partiellement ou totalement incapables de coder pour l'enzyme naturelle.
- 30 8. Procédé selon l'une des revendications 3 à 7 caractérisé en ce que la modification génétique consiste en une disruption d'un des gènes impliqués dans la biosynthèse des précurseurs des streptogramines du groupe B.
9. Procédé selon l'une des revendications précédentes caractérisé en ce que la souche mutante mise en œuvre dérive de la souche S. pristinaespiralis et de préférence de la souche S. pristinaespiralis SP92.

10. Procédé selon la revendication 9 caractérisé en ce qu'il s'agit de préférence de la souche SP92: pVRC508.

11. Procédé selon la revendication 9 caractérisé en ce qu'il s'agit de préférence
5 de la souche SP212.

12. Procédé selon la revendication 9 caractérisé en ce qu'il s'agit de préférence de la souche SP92pipA::Qam^R.

10 13. Procédé selon la revendication 9 caractérisé en ce qu'il s'agit de préférence de la souche SP92hpaA::Qam^R.

14. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisé en ce que le précurseur original, introduit dans le milieu de culture, est choisi parmi 15 des dérivés ou analogues d'acides aminés et d'acides alpha-cétocarboxyliques.

15. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisé en ce que le précurseur original est de préférence choisi de manière à être apparenté au précurseur dont la biosynthèse est altérée.

20 16. Procédé selon la revendication 14 ou 15 caractérisé en ce que le précurseur original est de préférence un dérivé de phénylalanine lorsque le gène, dont l'expression est altérée, concerne la biosynthèse du DMPAPA.

25 17. Procédé selon l'une des revendications précédentes utile pour préparer de la pristinamycine IB.

18. Séquence nucléotidique caractérisée en ce qu'elle est choisie parmi:

- (a) tout ou partie des gènes papC (SEQ ID n° 2), papB (SEQ ID n° 3), pipA 30 (SEQ ID n° 5), snbF (SEQ ID n° 6) et hpaA (SEQ ID n° 8),
 - (b) les séquences hybrideant avec tout ou partie des gènes (a) et,
 - (c) les séquences dérivées des séquences (a) et (b) en raison de la dégénérescence du code génétique.

19. Séquence nucléotidique selon la revendication 18 caractérisée en ce qu'elle est choisie parmi les gènes papC (SEQ ID n° 2), papB (SEQ ID n° 3), pipA (SEQ ID n° 5), smbF (SEQ ID n° 6) et hpaA (SEQ ID n° 8).

20. ADN recombinant comprenant un gène choisi parmi les gènes papC (SEQ ID n° 2), papB (SEQ ID n° 3), pipA (SEQ ID n° 5), smbF (SEQ ID n° 6) et hpaA (SEQ ID n° 8).

21. Vecteur caractérisé en ce qu'il comprend une séquence nucléotidique selon la revendication 18 ou 19 ou un ADN recombinant selon la revendication 20.

22. Utilisation d'une séquence selon la revendication 18 ou 19 et/ou d'un vecteur selon la revendication 21 pour la préparation de métabolites.

23. Polypeptide résultant de l'expression d'une séquence selon la revendication 18 ou 19.

24. Souche mutante S. pristinaespiralis caractérisée en ce qu'elle possède au moins une modification génétique au niveau d'un de ses gènes papC (SEQ ID n° 2), papB (SEQ ID n° 3), pipA (SEQ ID n° 5), smbF (SEQ ID n° 6) et/ou hpaA (SEQ ID n° 8).

25. Souche mutante selon la revendication 24 caractérisée en ce qu'il s'agit de la souche SP92pipA::Ωam^R.

26. Souche mutante selon la revendication 24 caractérisée en ce qu'il s'agit de la souche SP92hpaA::Ωam^R.

27. Souche mutante S. pristinaespiralis caractérisée en ce qu'elle possède une modification génétique consistant en une disruption du gène papA par double recombinaison homologue telle que SP212.

28. Composé caractérisé en ce qu'il s'agit du 4-trifluorométhoxyphénylalanine, 3-méthylaminophénylalanine, 3-méthylthiophénylalanine, 3-fluoro4-méthylphénylalanine, l'acide méthylaminophénylpyruvique, 3-éthoxyphénylalanine, 4- allylaminophénylalanine, 4- diallylaminophénylalanine, 4- allyl éthylaminophénylalanine, 4- éthyl propylaminophénylalanine, 4- éthyl isopropylaminophénylalanine,

éthylméthylcyclopropylaminophénylalanine, 4-(1-pyrrolidinyl) phénylalanine, 4-éthylthiométhylphénylalanine, 4-O-(2-chloroéthyl) tyrosine, 3-diméthylaminophénylalanine et 3-éthylaminophénylalanine.

29. Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle contient au moins
5 un composé selon la revendication 1 ou 2 en association ou non avec une streptogramine du groupe A.

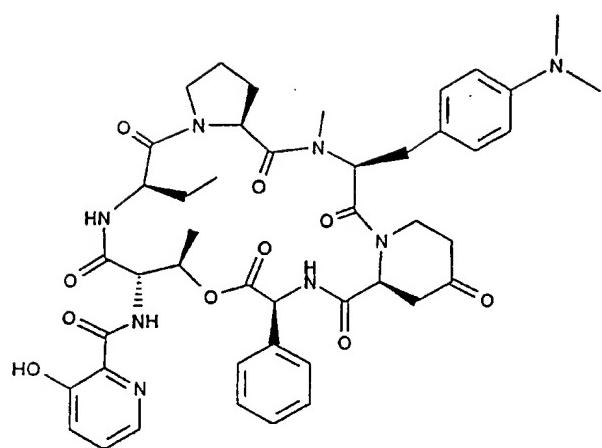
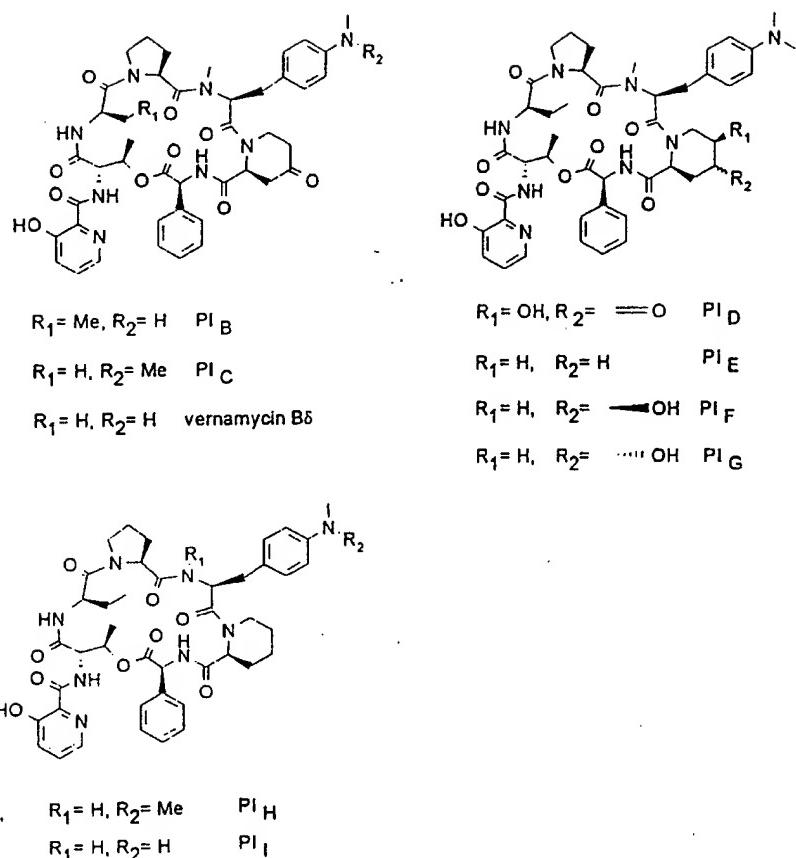


Figure 1



PI_B = pristinamycin I_B, vernamycin B_B, ostreoglycin B₂

PI_C = pristinamycin I_C, vernamycin B_γ, ostreoglycin B₁.

Figure 2

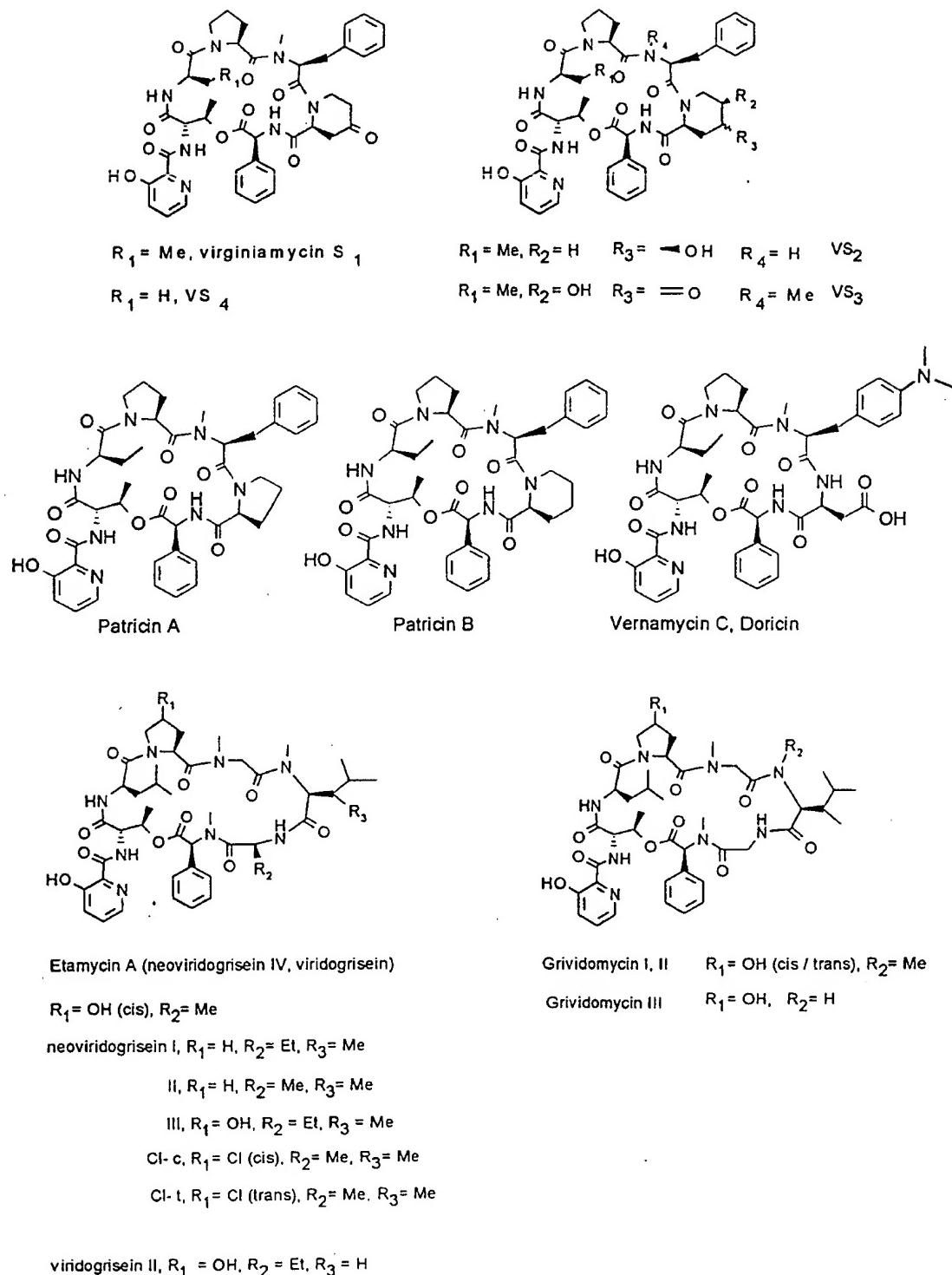


Figure 3

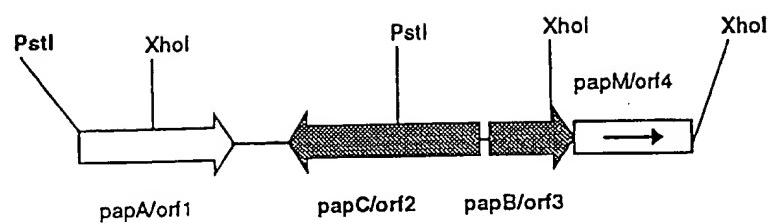


Figure 4

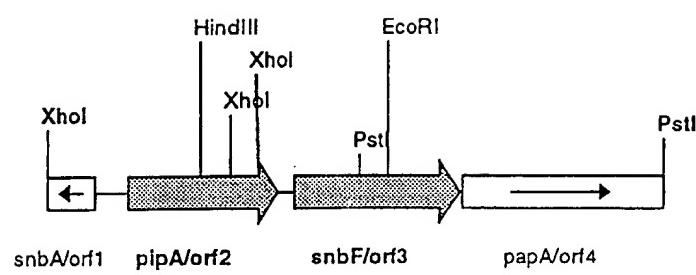


Figure 5

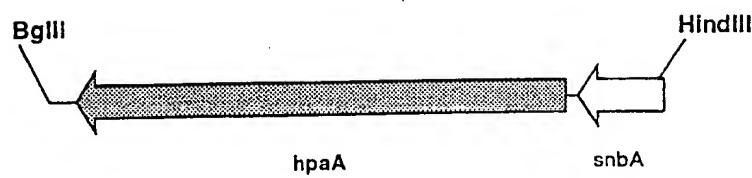


Figure 6

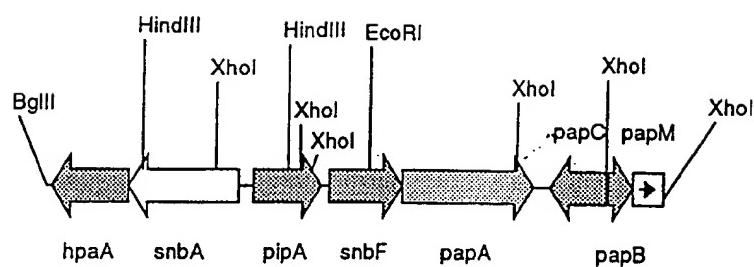


Figure 7

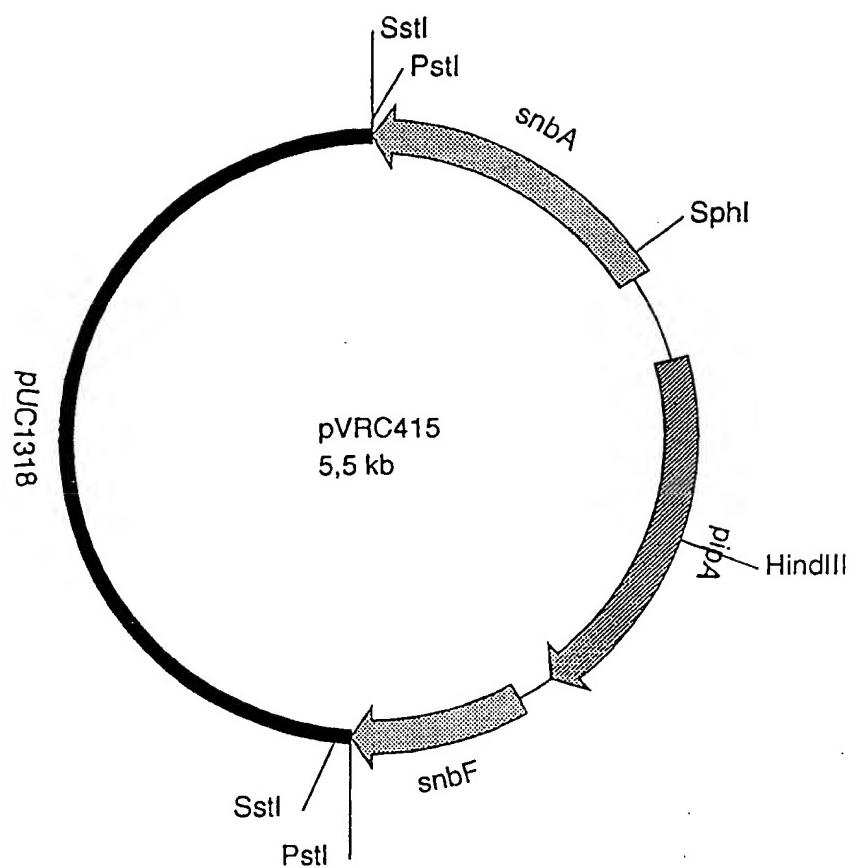


Figure 8

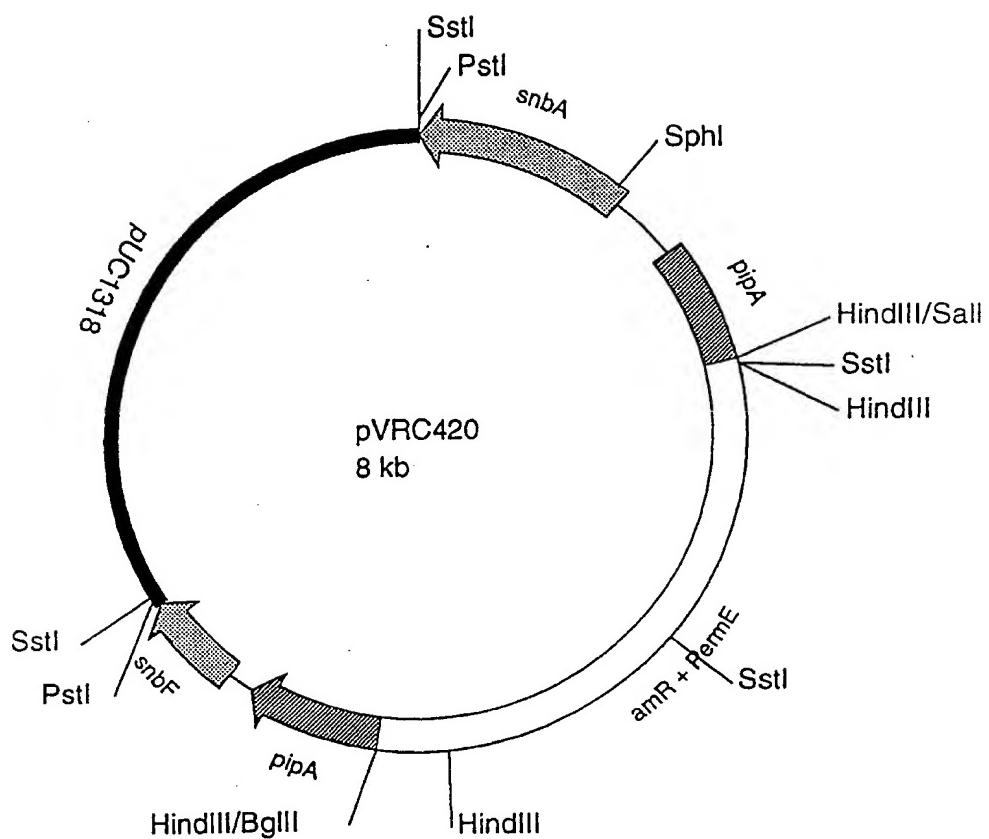


Figure 9

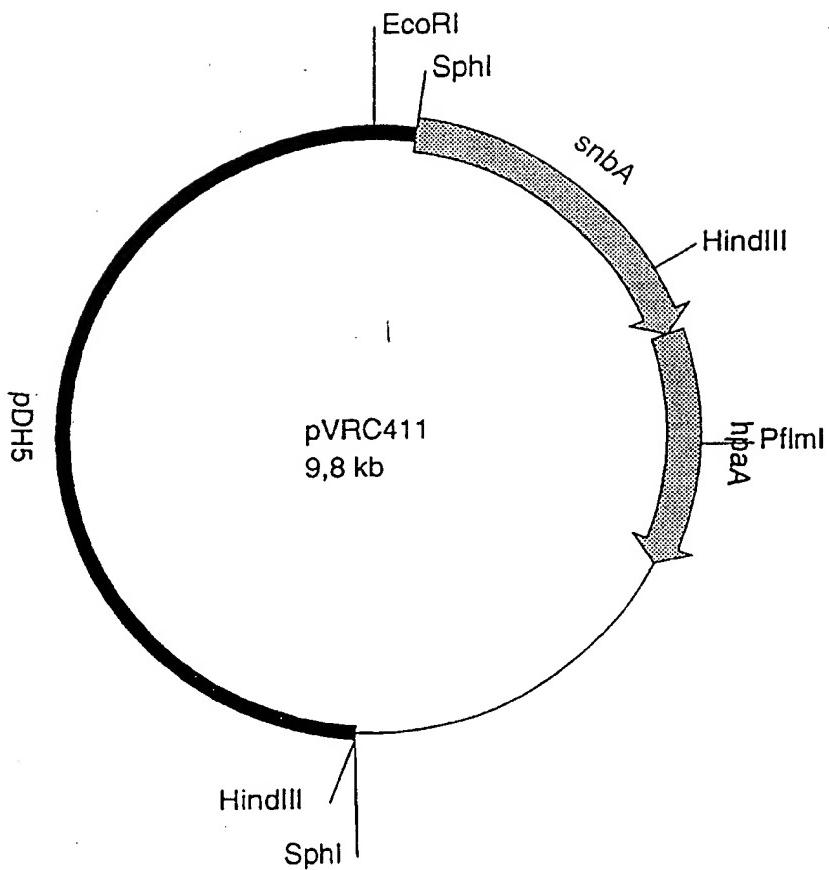


Figure 10

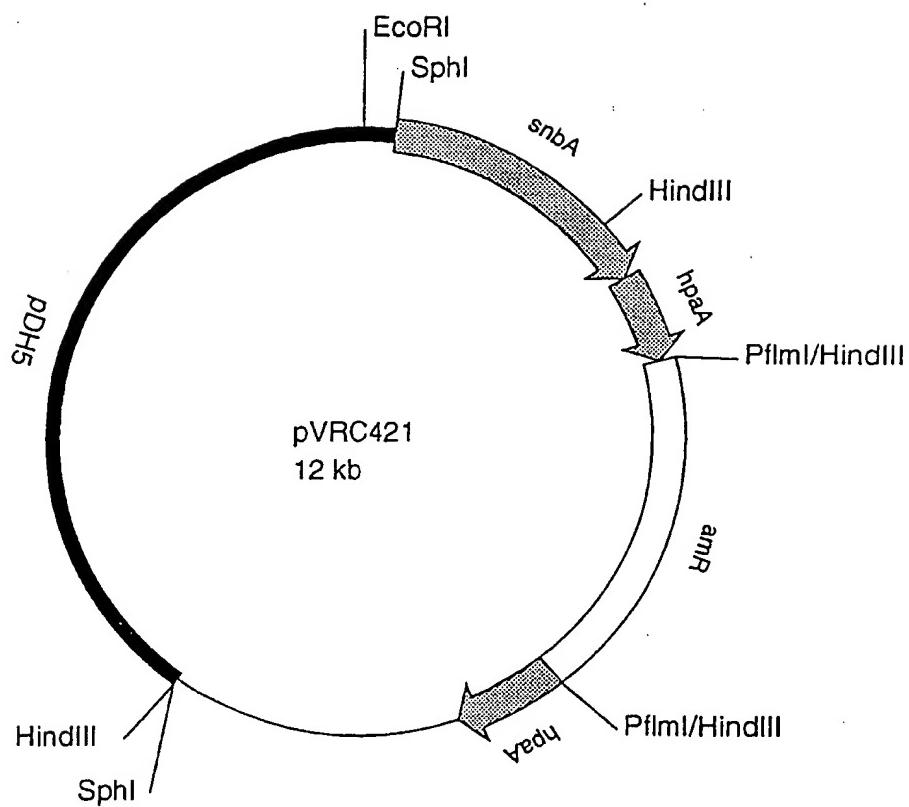


Figure 11

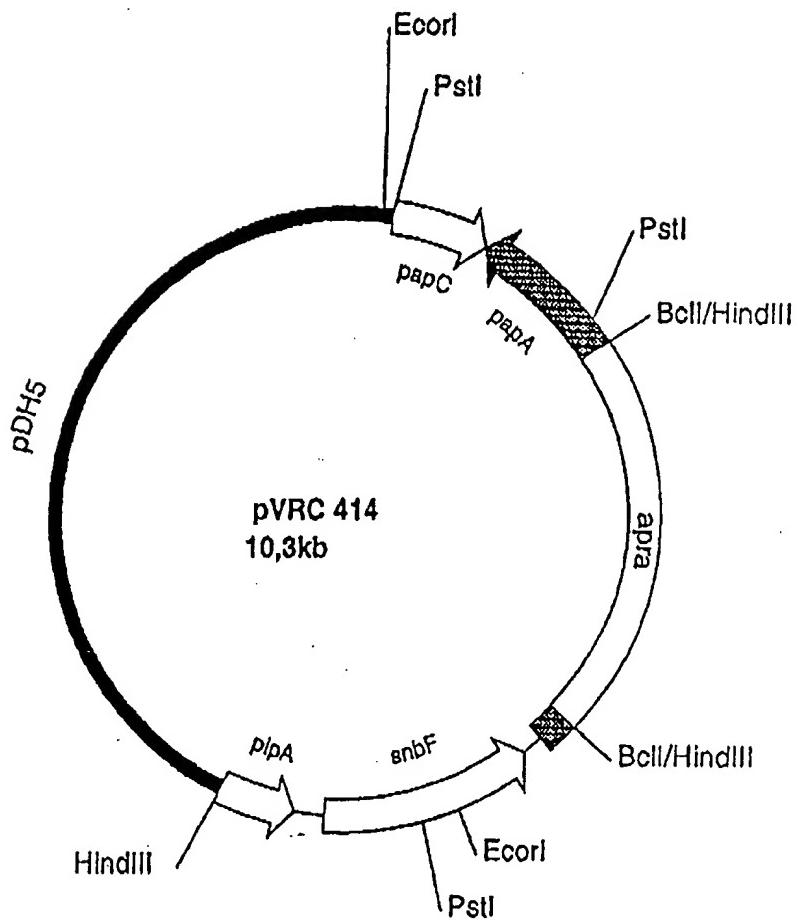
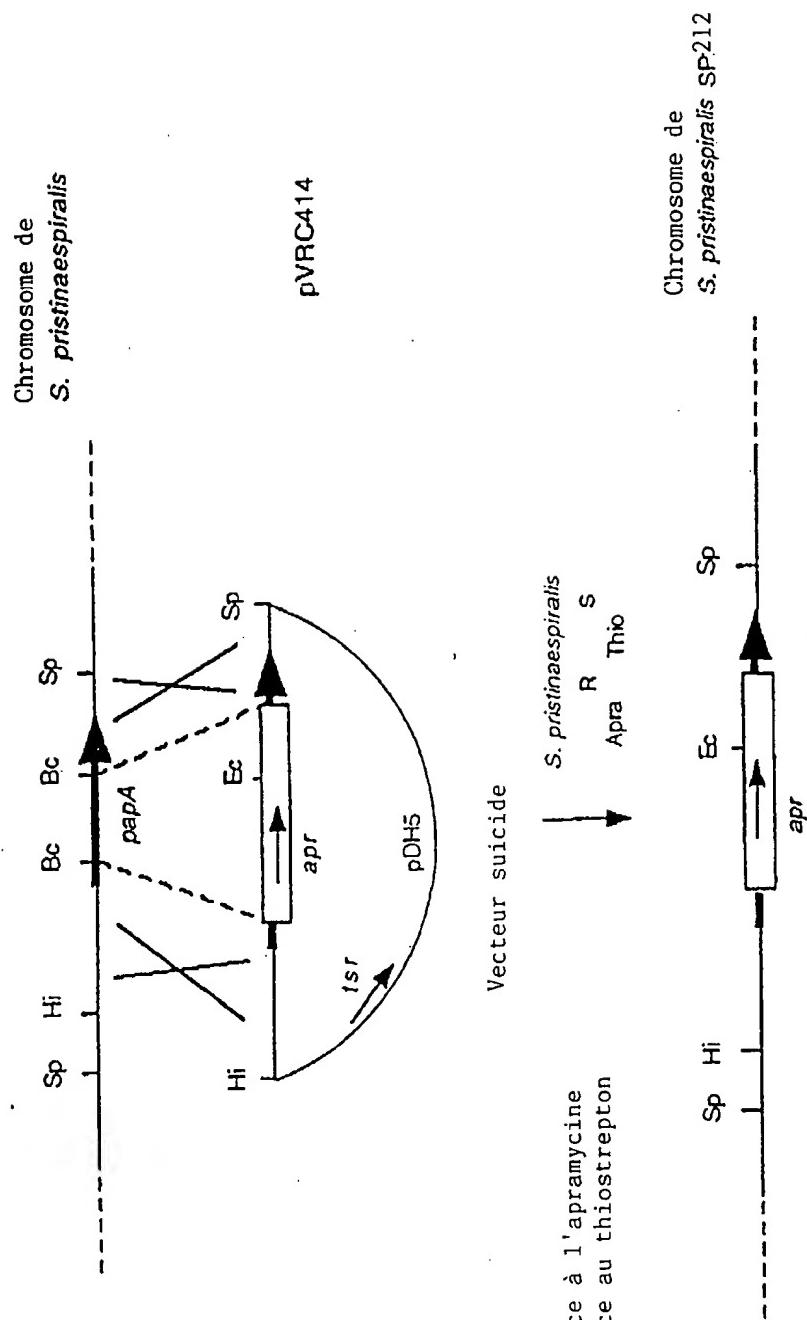


Figure 12



apr : résistance à l'apramycine
tsr : résistance au thiostrepton

Figure 13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internal Application No
PCT/FR 95/00889

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 IPC 6 C12N15/52 C12N15/76 C07K7/06 C12N1/21 A61K38/08
 C07C229/36 C07C229/42 C07C321/28 C07D295/135 // (C12N1/21,
 C12R1:465)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C07K C12N A61K C07C

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO,A,94 08014 (RHONE POULENC RORER SA ;BLANC VERONIQUE (FR); BLANCHE FRANCIS (FR)) 14 April 1994 cited in the application see page 2, line 23 - page 4, line 2; claims; example 5 * Seq. ID. 10 * see page 4, line 27 - page 5, line 18 ---	1,3-27, 29
X	WO,A,93 20182 (RHONE POULENC RORER SA ;BARRERE GENEVIEVE (FR); JUMEL CATHERINE (F) 14 October 1993 see claims; examples ---	1,3-27, 29
A	EP,A,0 133 096 (RHONE POULENC SANTE) 13 February 1985 see the whole document ---	1,2,29 -/-

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

& document member of the same patent family

1

Date of the actual completion of the international search

4 October 1995

Date of mailing of the international search report

17.10.95

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 cpo nl.
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Fuhr, C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internal Application No	PCT/FR 95/00889
-------------------------	-----------------

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	J. AM. CHEM. SOC. (1990), 112(13), 5212-19 CODEN: JACSAT; ISSN: 0002-7863, BRESLOW, RONALD ET AL 'Artificial transaminases linking pyridoxamine to binding cavities: controlling the geometry' see page 5214, right column, last paragraph - page 516, left column, paragraph 1; table I ---	28
X	HELV. CHIM. ACTA (1974), 57(8), 2406-20 CODEN: HCACAV, ZELLER, E. ALBERT ET AL 'Ophidian L-amino acid oxidases. 6. Interaction of ophidian L-amino acid oxidase with its substrates and inhibitors. Role of molecular geometry and electron distribution' see figures 2,3; table 1 ---	28
X	US,A,4 156 734 (STONE CLEMENT A) 29 May 1979 see claims; examples -----	28

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Internat'l Application No

PCT/FR 95/00889

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO-A-9408014	14-04-94	FR-A-	2696189	01-04-94
		AU-B-	4823993	26-04-94
		CA-A-	2145523	14-04-94
		EP-A-	0662134	12-07-95
		FI-A-	951403	24-03-95
-----	-----	-----	-----	-----
WO-A-9320182	14-10-93	FR-A-	2689518	08-10-93
		AU-B-	3893493	08-11-93
		CA-A-	2131087	02-10-93
		EP-A-	0633928	18-01-95
		FI-A-	944563	30-09-94
		JP-T-	7505288	15-06-95
		ZA-A-	9302225	14-10-93
-----	-----	-----	-----	-----
EP-A-0133096	13-02-85	FR-A-	2549062	18-01-85
		JP-C-	1815539	18-01-94
		JP-B-	5022717	30-03-93
		JP-A-	60038385	27-02-85
		US-A-	4617290	14-10-86
-----	-----	-----	-----	-----
US-A-4156734	29-05-79	AU-B-	511964	18-09-80
		AU-B-	2192077	10-08-78
		BE-A-	851051	03-08-77
		DE-A-	2705863	18-08-77
		FR-A,B	2340729	09-09-77
		GB-A-	1527181	04-10-78
		JP-A-	52099227	19-08-77
		NL-A-	7700945	16-08-77
		US-A-	4170654	09-10-79
		US-A-	4160835	10-07-79
-----	-----	-----	-----	-----

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No
PCT/FR 95/00889

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE				
CIB 6	C12N15/52	C12N15/76	C07K7/06	C12N1/21 A61K38/08
	C07C229/36	C07C229/4?	C07C321/28	C07D295/135 // (C12N1/21, C12R1:465)

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C07K C12N A61K C07C

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO,A,94 08014 (RHONE POULENC RORER SA ; BLANC VERONIQUE (FR); BLANCHE FRANCIS (FR)) 14 Avril 1994 cité dans la demande voir page 2, ligne 23 - page 4, ligne 2; revendications; exemple 5 * Seq. ID. 10 * voir page 4, ligne 27 - page 5, ligne 18 ---	1,3-27, 29
X	WO,A,93 20182 (RHONE POULENC RORER SA ; BARRERE GENEVIEVE (FR); JUMEL CATHERINE (F) 14 Octobre 1993 voir revendications; exemples ---	1,3-27, 29
A	EP,A,0 133 096 (RHONE POULENC SANTE) 13 Février 1985 voir le document en entier ---	1,2,29 -/-

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *&* document qui fait partie de la même famille de brevets

1

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

4 Octobre 1995

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

17.10.95

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patenttaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Fuhr, C

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demar. Internationale No
PCT/FR 95/00889

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	J. AM. CHEM. SOC. (1990), 112(13), 5212-19 CODEN: JACSAT; ISSN: 0002-7863, BRESLOW, RONALD ET AL 'Artificial transaminases linking pyridoxamine to binding cavities: controlling the geometry' voir page 5214, colonne de droite, dernier alinéa - page 516, colonne de gauche, alinéa 1; tableau I ---	28
X	HELV. CHIM. ACTA (1974), 57(8), 2406-20 CODEN: HCACAV, ZELLER, E. ALBERT ET AL 'Ophidian L-amino acid oxidases. 6. Interaction of ophidian L-amino acid oxidase with its substrates and inhibitors. Role of molecular geometry and electron distribution' voir figures 2,3; tableau 1 ---	28
X	US,A,4 156 734 (STONE CLEMENT A) 29 Mai 1979 voir revendications; exemples -----	28

1

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale No

PCT/FR 95/00889

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)		Date de publication
WO-A-9408014	14-04-94	FR-A-	2696189	01-04-94
		AU-B-	4823993	26-04-94
		CA-A-	2145523	14-04-94
		EP-A-	0662134	12-07-95
		FI-A-	951403	24-03-95
-----	-----	-----	-----	-----
WO-A-9320182	14-10-93	FR-A-	2689518	08-10-93
		AU-B-	3893493	08-11-93
		CA-A-	2131087	02-10-93
		EP-A-	0633928	18-01-95
		FI-A-	944563	30-09-94
		JP-T-	7505288	15-06-95
		ZA-A-	9302225	14-10-93
-----	-----	-----	-----	-----
EP-A-0133096	13-02-85	FR-A-	2549062	18-01-85
		JP-C-	1815539	18-01-94
		JP-B-	5022717	30-03-93
		JP-A-	60038385	27-02-85
		US-A-	4617290	14-10-86
-----	-----	-----	-----	-----
US-A-4156734	29-05-79	AU-B-	511964	18-09-80
		AU-B-	2192077	10-08-78
		BE-A-	851051	03-08-77
		DE-A-	2705863	18-08-77
		FR-A,B	2340729	09-09-77
		GB-A-	1527181	04-10-78
		JP-A-	52099227	19-08-77
		NL-A-	7700945	16-08-77
		US-A-	4170654	09-10-79
		US-A-	4160835	10-07-79
-----	-----	-----	-----	-----